

Humboldt-Universität zu Berlin

Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät

Institut für Gartenbauwissenschaften

Fachgebiet Phytomedizin und Angewandte Entomologie



**Untersuchungen zur Funktion und Spezifität
pilzlicher Sekundärmetaboliten im Pathosystem
„Schwarze Sigatokakrankheit“ der Banane
(*Musa sp* - *Mycosphaerella fijiensis*)**

Von der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
zur Verleihung des akademischen Grades
„doctor rerum horticumarum“ (Dr. rer. hort.)
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Ing. agr. Reinhart Hoß
aus Hannover

Berlin 1998

Promotionsausschuß

Vorsitzender: Prof. Dr. F. Pohlheim

Berichter: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bochow
Prof. Dr. G. Deml

Weitere Mitglieder: Prof. Dr. C. Hecht-Buchholz
Dr. J. Helbig
Dr. K. D. Henschel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 5. Juni 1998

Prolog

VIRGINIA: 52. Inschrift: Ich begreife nicht.

GALILEI: Das ist gut. Das ist ein Anfang.

Bertolt Brecht (1938) Leben des Galilei.

Episode aus einer früheren Fassung der 14. Szene: *Der alte Galilei liest Montaigne*.

In: Versuche 15 (1957): 132-3.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
Verzeichnis der Abbildungen	iv
Verzeichnis der Tabellen	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii

1 Einleitung **8**

2 Literaturübersicht **10**

2.1 Begriffsbestimmungen und Modellsysteme **10**

2.1.1 Pflanzeigene Substanzen und Reaktionen	10
2.1.2 Erregereigene Substanzen	11
2.1.3 Wirt-Pathogenkomplex: Modellvorstellungen und Referenzsysteme	12

2.2 Wirtspflanze *Musa sp* **14**

2.3 Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* **17**

2.4 Pathosystem *Musa sp/Mf* **23**

2.4.1 Evolution	23
2.4.2 Infektion und Trophie	23
2.4.3 Symptomatologie und Wirtsreaktionen gegenüber <i>Mf</i>	26
2.4.4 Spezifität und genetische Basis des Wirt-Pathogenverhältnisses	27
2.4.5 Mechanismen der inkompatiblen Wirt-Pathogeninteraktion	29

3 Material und Methoden **34**

3.1 Untersuchungen der Wirtspflanze *Musa sp* **34**

3.1.1 In vitro-Kultur von <i>Musa sp</i>	34
3.1.2 Bestimmung der Enzymaktivität von PAL	36
3.1.3 Gewinnung von Sekundärmetaboliten aus <i>Musa</i> -Blattgewebe	37

3.2 Untersuchungen des Pathogens *Mf* **38**

3.2.1 In vitro-Kultur von <i>Mf</i>	38
3.2.2 Untersuchung der Sekundärmetaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges	39

3.3 Untersuchungen der Wirt-Pathogeninteraktionen **42**

3.3.1 Inokulation von Blattgewebe mit Pilzmyzel	42
3.3.2 Mikroskopische Untersuchungen von infizierten <i>Musa</i> -Kalli	42
3.3.3 Applikation von <i>Mf</i> -Metaboliten in <i>Musa</i> -Blattgewebe	43

4 Ergebnisse **44**

4.1 Wirtspflanze *Musa sp* **44**

4.1.1	<i>In vitro</i> -Kultur von <i>Musa sp</i>	44
4.1.2	Enzymaktivität der Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL)	46
4.1.3	Sekundärmetaboliten zur Abwehr pilzlicher Erreger	48
4.2	Pathogen <i>Mf</i>	49
4.2.1	<i>In vitro</i> -Kultur	49
4.2.2	Sekundärmetaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges	54
4.3	Interaktion <i>Musa cv</i> - <i>Mf</i>	65
4.3.1	Symptomentwicklung in <i>Musa cv</i> -Blattgewebe nach <i>Mf</i> -Inokulation	65
4.3.2	Mikroskopische Untersuchungen infizierter <i>Musa</i> -Kalli	70
4.3.3	Einfluß von <i>Mf</i> -Extrakten und -Metaboliten auf <i>Musa cv</i>	72
4.3.4	Einfluß von <i>Musa cv</i> auf <i>Mf</i> -Metaboliten	79
5	Diskussion	81
5.1	Charakterisierung der Wirtsreaktionen verschiedener <i>Musa cv</i>	81
5.2	Untersuchung des pilzlichen Sekundärstoffwechsels	85
5.3	Bestimmung der kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogeninteraktionen	89
5.3.1	Kritische Überprüfung des HST-Postulates im Pathosystem <i>Musa sp/Mf</i>	89
5.3.2	Funktionen des 2,4,8-THT in kompatiblen und inkompatiblen <i>Musa cv/Mf</i> -Interaktionen	93
5.4	Schlußfolgerungen und Ausblick	93
6	Zusammenfassungen	93
6.1	Zusammenfassung (dt.)	93
6.2	Abstract (engl.)	93
6.3	Resumen (span.)	93
7	Literatur	93
8	Anhang	XCIII
8.1	Verwendete Materialien und Geräte	XCIII
8.2	Methoden	XCIII
	Danksagung	VII

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Primärstoffwechsel der Pflanze und Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten in pflanzlichen und pilzlichen Organismen (MANSFIELD 1983)	19
Abb. 2	Acetat-Polymalonat-Biosyntheseweg von Hydro- und Naphtochinonen (WHEELER und STIPANO-VIC 1985), Struktur (BUCHENAUER 1990) und hypothetische Wirkzentren (rote Pfeile) des Melanin-hemmstoffes Tricyclazol® (TOKOUSBALIDES und SISLER 1979, VIVIANI et al 1993); weitere Angaben im Text	21
Abb. 3	Entwicklung der Gelben Sigatokakrankheit im Pathosystem <i>Musa sp./Mycosphaerella musicola</i> (AGRIOS 1988)	25
Abb. 4	Multiplikationsraten von <i>Musa cv</i> auf MS-Nährmedium mit unterschiedlicher Vitaminzusammensetzung drei Wochen nach Umsetzen (n = 12, Mittelwert ± SD)	44
Abb. 5	PAL-Aktivität verschiedener <i>Musa cv</i> nach Inokulation mit <i>Mf</i> (n = 3, gleiche Buchstaben bezeichnen nichtsignifikante Unterschiede nach Duncan, p = 0.05)	46
Abb. 6	PAL-Aktivität von <i>Musa cv</i> Yangambi km 5 nach Inokulation mit <i>Mf</i> und Applikation des Wirkstoffes Tricyclazol® (n = 3, gleiche Buchstaben bezeichnen nichtsignifikante Unterschiede nach Duncan, p = 0.05)	47
Abb. 7	Trennung von Sekundärmetaboliten verschiedener <i>Musa cv</i> (DH = Dominico Hartón, Y = Yangambi km 5, C = Cachaco) durch TLC nach Elizitierung mit Kanamycin	48
Abb. 8	Chromatographische Kennwerte eines aus <i>Musa cv</i> Yangambi km 5 nach Elizitierung mit Kanamycin isolierten TLC-Spots ($R_f = 0.35$) mit antimikrobieller Wirkung:	49
Abb. 9	<i>Mf</i> -Myzel unter <i>in vitro</i> -Bedingungen: a. Konidienträger (Vergr. 1500x, Balkenlänge = 20 µm); b. Konidien suspension (Vergr. 600x, Balkenlänge = 50 µm)	50
Abb. 10	Konidienproduktion (kumuliert aus Daten der Tabelle 8) von <i>Mf</i> auf verschiedenen Nährmedien im Verlaufe der Inkubationsperiode	51
Abb. 11	Myzelverteilung von <i>Mf</i> -HON auf verschiedenen Nährböden (50 dpi)	52
Abb. 12	Myzelwachstum von <i>Mf</i> -Isolaten und Farbreaktion auf PDA mit verschiedenen Konzentrationen von Trizyclazol® (oben: ohne; Mitte: 10; unten: 1000 ppm Trizyclazol)	52
Abb. 13	Entwicklung der Myzeltrockenmasse im Verlauf der Inkubation von <i>Mf</i> -NIG in M-1D-Nährmedium bei Verwendung unterschiedlicher Kulturgefäße (System A : flaches Kulturgefäß, Luftaustausch, gute Durchmischung; System B : Rundkolben, Luftabschluß, geringe Durchmischung); n = 4, Inokulationsgewicht = 225 mg.	53
Abb. 14	Entwicklung des pH-Wertes im Verlauf der Inkubation von <i>Mf</i> -NIG in M-1D-Nährmedium bei Verwendung unterschiedlicher Kulturgefäße (System A, B: siehe Abbildung 14; Kontrolle: nicht inokuliert); n = 4, Inokulationsgewicht = 225 mg.	53
Abb. 15	Trennung von Rohextrakten aus <i>Mf</i> -Kulturfiltraten durch TLC (System A):	54
Abb. 16	Elution der Pentaketidmetaboliten 1,5-DHN und Juglon zur Bewertung der untersuchten Festphasensysteme (ODS = Oktadecylsilan, CN-U = Cyanopropylsilan, NH ₂ = Aminopropylsilan, SiOH = Silica): Anteil wiedergewonnener Substanzen in den verschiedenen Stufen der Festphasenextraktion (↓ 1,5-DHN, ↓ Juglon); weitere Angaben im Text	55
Abb. 17	HPL-Chromatogramme eines <i>Mf</i> -Extraktes nach SPE-NH ₂ :	57
Abb. 18	HPL-Chromatogramm und spektrale Kennwerte von 2,4,8-THT:	58
Abb. 19	Massenspektrogramm bei 160°C (t = 2.2 min) eines TLC-Spots ($R_f = 0.34$) aus <i>Mf</i> -Rohextrakten	60
Abb. 20	Massenspektrogramm der GC/MS-Kopplung bei $t_R = 8.95$ (Probe mit BSTFA derivatisiert, TLC-getrennt) aus <i>Mf</i> -Rohextrakten	60

Abb. 21	2,4,8-THT-Gehalt ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) und -Konzentration (nM) in Kulturfiltraten verschiedener <i>Mf</i> -Isolate nach 45 Tagen Inkubationsdauer mit M-1D-Nährlösung	61
Abb. 22	Konzentrationen verschiedener Pentaketid-Metaboliten in Kulturfiltraten von <i>Mf</i> -NIG im Verlauf der Inkubationsdauer in M-1D-Nährlösung	62
Abb. 23	Prozentuale Gehalte (mg g^{-1} DW) und Konzentrationen (nM) an 2,4,8-THT in Nährsuspensionen verschiedener <i>Mf</i> -Isolate bei Anwendung von 53.2 μM Tricyclazol nach 45 Tagen Inkubationsdauer in M-1D-Nährlösung, relativ zur unbehandelten Kontrolle	63
Abb. 24	Konzentrationen verschiedener Pentaketid-Metaboliten in Nährsuspensionen von <i>Mf</i> -294 bei verschiedenen Dosen des Wirkstoffes Tricyclazol [®] nach 45 Tagen Inkubationsdauer in M-1D-Nährlösung	64
Abb. 25	Korrelation zwischen den Konzentrationen von Flaviolin und 2,4,8-THT in Kulturfiltraten von <i>Mf</i> (Mittelwert \pm Konfidenzintervall 95 %)	65
Abb. 26	Symptomausprägungen der Schwarzen Sigatokakrankheit auf inokulierten Blatthälften von <i>Musa</i> cv Yangambi km 5 (oben: 16 dpi, Stadium 1) und Dominico Hartón (zweite von oben: 25 dpi, Stadium 2; zweite von unten: 32 dpi, Stadium 3; unten: 40 dpi, Stadium 4); Stadien nach FULLERTON und OLSEN (1995)	66
Abb. 27	Entwicklung der Krankheitssymptome auf verschiedenen <i>Musa</i> cv nach Inokulation mit Myzel des <i>Mf</i> -Isolates NIG unter Klimakammer-Bedingungen (Mittelwerte, n = 5)	67
Abb. 28	Symptomausprägung auf <i>Musa</i> cv Cachaco 8 dpi mit <i>Mf</i> -Myzel: a. Anwendung von 4.0 mM Tricyclazol [®] auf inokulierte Blatthälfte; b. Kontrolle (inokuliert ohne Tricyclazol)	68
Abb. 29	Entwicklung der Krankheitssymptome auf verschiedenen <i>Musa</i> cv nach Inokulation mit Myzel des <i>Mf</i> -Isolates NIG unter Klimakammer-Bedingungen (Mittelwerte, n = 4) bei Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol [®] (4.0 mM, im Vergleich inokulierte Kontrolle ohne Wirkstoff)	69
Abb. 30	<i>Mf</i> -inokulierter Kallus von <i>Musa</i> cv Cachaco nach 3 Wochen Inkubationszeit:	70
Abb. 31	TEM <i>Mf</i> -inokulierter Kalli von <i>Musa</i> cv Cachaco (a, b) und Yangambi km 5 (c, d)	71
Abb. 32	Anwendung der „leaf-puncture-wound overlay technique“ (STIERLE et al 1991, 1992) auf <i>Musa</i> sp: a. Feuchte Kammer zur Inkubation; b. nekrotische Flecken durch Juglon in verschiedenen Konzentrationen auf <i>Musa</i> cv Dominico Hartón (K = Kontrolle, n = 3)	72
Abb. 33	Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener <i>Musa</i> cv 48 Stunden nach Anwendung von <i>Mf</i> -Rohextrakten mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“	73
Abb. 34	Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener <i>Musa</i> cv 48 Stunden nach Anwendung von <i>Mf</i> -Extrakten aus der SPE-Spülung (Hexan) mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“	74
Abb. 35	Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener <i>Musa</i> cv 48 Stunden nach Anwendung von 2,4,8-THT aus <i>Mf</i> -Rohextrakten mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“ (Applikationsmenge jeweils 5 μl)	75
Abb. 36	Dosis-Wirkungsbeziehungen von 2,4,8-THT auf verschiedene <i>Musa</i> cv und sortenspezifische Konzentrationen zur Erzeugung eines nekrotischen Fleckes von 1.0 mm Durchmesser	75
Abb. 37	Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener <i>Musa</i> cv 48 Stunden nach Anwendung von Juglon mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“ (Applikationsmenge jeweils 5 μl)	77
Abb. 38	Nekrose auf Blattstücken verschiedener <i>Musa</i> cv nach Einwirkung von Juglon unter Anwendung der „leaf-disk infiltration technique“ (LEPOIVRE und ACUNA 1990)	78

Abb. 39	Leitfähigkeit verschiedener <i>Musa cv</i> nach Vakuuminfiltration und Inkubation mit Juglon-lösungen verschiedener Konzentrationen	78
Abb. 40	Konzentration des Sekundärmetaboliten 2,4,8-THT im Kulturfiltrat von <i>Mf</i> -309 nach 12 Tagen Inkubation mit Blattextrakten verschiedener <i>Musa cv</i>	79
Abb. 41	Konzentration des Sekundärmetaboliten 2,4,8-THT im Kulturfiltrat von <i>Mf</i> -309 nach 12 Tagen Inkubation mit Blattextrakten vor und 24 bzw. 48 Stunden nach Behandlung von <i>Musa cv</i> Yangambi km 5 mit Kanamycin	80
Abb. 42	Beziehungen zwischen der direkten Wirkung von Toxinen und deren mögliche Funktionen in kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogenverhältnissen	92
Abb. 43	Synoptische Darstellung der zeitlichen Abfolge biochemischer und physiologischer Interaktionen von <i>Mf</i> und dessen Metaboliten 2,4,8-THT mit verschiedenen <i>Musa cv</i>	93
Abb. 44	Material und Methoden der Gewinnung von Sekundärmetaboliten aus <i>Mf</i> -Flüssigkulturen (A, dicke schwarze Pfeile), Applikation von pilzlichen Substanzen auf Blattgewebe verschiedener <i>Musa cv</i> (B, dünne schwarze Pfeile) und Nutzung pflanzlicher Extrakte zur Inkubation des Pilzes (C, farbige durchgezogene Pfeile)	XCIII

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Taxonomische Klassifikation von <i>Musa sp</i> (STOVER und SIMMONDS 1987, STRASBURGER 1991) und <i>Mf</i> (STOVER 1980, AGRIOS 1988, PONS 1990, CARLIER et al 1993, HOFFMANN et al 1994)	17
Tab. 2	Stadien der Symptomentwicklung und Graduierung der Reaktionen von <i>Musa cv</i> nach Inokulation mit <i>Mf</i> (FULLERTON und OLSEN 1995)	26
Tab. 3	Spezifität von Wirt-Pathogen-Beziehungen bei <i>Mycosphaerella spp</i> und <i>Musa sp</i>	28
Tab. 4	Literaturübersicht zu Untersuchungen von Abwehrmechanismen von <i>Musa sp</i> gegenüber pilzlichen Krankheitserregern	29
Tab. 5	Sortenbezeichnungen, Genom, Reaktion gegenüber <i>Mf</i> , Herkunft und Genbank-Sammlung der im FG Phytomedizin der HU Berlin kultivierten <i>Musa cv</i> (STOVER und SIMMONDS 1987, OKOLE 1995, INIBAP 1997)	35
Tab. 6	Bezeichnungen und Herkünfte der Isolate von <i>Mf</i>	38
Tab. 7	Charakteristika der <i>in vitro</i> -Kultur ausgewählter <i>Musa cv</i> nach drei Wochen Inkubationsdauer	45
Tab. 8	Periodische Produktion von <i>Mf</i> -Konidien auf verschiedenen Nährmedien	50
Tab. 9	Gewinnung von Rohextrakten aus Nährlösungen von <i>Mf</i> -CAM und Gehalt ausgewählter Sekundärmetaboliten in verschiedenen Stufen der Probenaufbereitung	56
Tab. 10	Peakbericht des HPL-Chromatogrammes (Abbildung 18b) aus <i>Mf</i> -Extrakten mit identifizierten Substanzen und chromatographischen Kennwerten	58
Tab. 11	Chromatographische und photometrische Charakterisierung von Hydro- und Naphto-chinonen des Pentaketid-Metabolismus von <i>Mf</i>	59
Tab. 12	Statistische Kennwerte der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen 2,4,8-THT und Blattnekrosen auf den verschiedenen <i>Musa cv</i>	76
Tab. 13	Nährstoffkonzentrationen der <i>in vitro</i> -Kultur von <i>Musa sp</i> (VUYLSTEKE 1989, SIGMA 1994, OKOLE 1995)	XCIII
Tab. 14	Nährstoffkonzentrationen der <i>in vitro</i> -Kultur von <i>Mf</i> (NIRENBERG 1976, PINKERTON und STROBEL 1976)	XCIII
Tab. 15	Verbrauchsmaterialien	XCIII
Tab. 16	Chemikalien und Substrate	XCIII

Tab. 17 Geräte	XCIII
Tab. 18 TL-chromatographische Systeme	XCIII
Tab. 19 HPL-chromatographische Systeme	XCIII

Abkürzungsverzeichnis

AU	Absorptionseinheiten
BSTFA	N,O-Bis-Silyl-trifluoracetamid
CA	trans-Zimtsäure
CHCl ₃	Chloroform
Da	Dalton
1,5-DHN	1,5-Dihydroxynaphtalin
dpi	Tag(e) nach Inokulation
DW	Trockenmasse
E	Einstein
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FW	Frischmasse
GC	Gaschromatographie
2-HJ	2-Hydroxyjuglon
3-HJ	3-Hydroxyjuglon
hpi	Stunde(n) nach Inokulation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR, HS	hochgradige Resistenz, Hypersensitivitätsreaktion
HST	wirtsspezifisches Toxin
kat	katal
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
<i>Mf</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
M-1D-Medium	Nährmedium nach Filner, mod. (PINKERTON und STROBEL 1976, Tabelle 14)
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Nährmedium nach Murashige und Skoog (SIGMA 1994, Tabelle 13)
MW	Molekularmasse
m/z	Molekülmasse pro Ladung
n	Anzahl der Wiederholungen
ODS	Octadecylsilan (C-18)
PAL	Phenylalanin-Ammoniumlyase
pkat	picokatal (Enzymaktivität: Umsatz von 1 pM Substrat s ⁻¹)
PR	partielle Resistenz
RH	relative Luftfeuchte (%)
R _f	Retentionsfaktor (TLC)
rpm	Umdrehungen min ⁻¹
S	Anfälligkeit (susceptibility)
SH-Medium	Nährmedium nach Schenk und Hildebrandt (SIGMA 1994, Tabelle 13)
SNA	slight nutrient agar (NIRENBERG 1976)
SPE	Festphasenextraktion
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TLC	Dünnschichtchromatographie
t _R	Retentionszeit (HPLC)
2,4,8-THT	2,4,8-Trihydroxytetralon
v	Volumen
w	Masse
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

Das Pathosystem der Banane „Schwarze Sigatoka-Krankheit“ besteht aus der Wirtspflanze Banane (*Musa sp.*, Familie Musaceae) und dem pilzlichen Erreger *Mycosphaerella fijiensis* (*Mf*, Ascomycotina, anamorph: Deuteromycotina) sowie deren Interaktionen, von denen die Funktion und Spezifität der Sekundärmetaboliten des Pathogens im Zentrum der vorliegenden Untersuchung stehen.

Die Banane ist eine bedeutende Kulturart der tropischen und subtropischen Agrarökosysteme, wo sie sowohl als stärkehaltiges Grundnahrungsmittel (Kochbananen) wie auch als Obst (Dessertbananen) angebaut wird (STOVER und SIMMONDS 1987). Der Natural- und Monetärertrag wird in zunehmendem Maße durch den Krankheitserreger *Mf* gefährdet, der seit dem ersten Auftreten vor etwa 30 Jahren in Fiji fast alle angebauten Bananensorten (mit Ausnahme einiger Kochbananen) in fast allen Anbaugebieten (mit Ausnahme einiger karibischer Inseln und Australiens) befällt (JEGER et al 1995). Die Anwendung chemotherapeutischer Maßnahmen mit systemischen Fungiziden verschiedener Wirkstoffgruppen stellt die bis heute bevorzugte Methode zur Kontrolle des Erregers dar (STOVER 1990). Die ökotoxikologischen, ökonomischen und sozialen Auswirkungen des intensiven Fungizideinsatzes sowie die zunehmenden Resistenzerscheinungen des Pathogens gegenüber einigen Wirkstoffen erfordern die Entwicklung weiterer Bekämpfungsverfahren (FULLERTON 1990).

Dabei kommt der Erkennung und Ausnutzung natürlicher Resistenzmechanismen einiger *Musa*-Sorten eine hohe Priorität zu (JEGER et al 1995). In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren des Erregers von besonderer Bedeutung, um zu züchterischer Selektion und genbiologischer Transformation resistenter *Musa*-Phänotypen gelangen zu können (NOVAK et al 1993). Der Erfolg von Gewebekulturtechniken in *Musa sp.* schuf die Voraussetzungen zur Multiplikation der so gewonnenen Sorten und deren Einführung in den Bananenanbau (ORTIZ 1995).

Die Isolierung und Bestimmung von Sekundärmetaboliten aus *Mf* führte zu der Formulierung des Postulates, diese wirkten als wirtsspezifische Toxine gegenüber verschiedenen *Musa cv* (STIERLE et al 1991). Damit wäre eine Nutzung spezifischer Sekundärstoffe zur Selektion resistenter Sorten der Wirtspflanze möglich. Besondere Bedeutung wird dabei dem pilzlichen Sekundärmetaboliten 2,4,8-Trihydroxytetralon (2,4,8-THT) beigemessen, der als Endprodukt des Pentaketid-Biosyntheseweges angesehen wird (GREENBLATT und WHEELER 1986).

Allerdings ist die Anwendung der wirtsspezifischen Toxinhypothese auf das Pathosystem *Musa/Mf* aus folgenden Gründen kritisch zu hinterfragen:

- Widerspruch zwischen der hemibiotrophen Ernährungsweise des Pilzes und der postulierten Funktion wirtsspezifischer Toxine in der frühen Phase der Pathogenese (LEPOIVRE et al 1993);
- fehlender Nachweis einer ursächlichen Bedeutung toxischer Sekundärstoffe aus *Mf* für die Krankheitsentwicklung (JEGER et al 1995);
- Paradigmenwechsel bei der Bewertung von Wirkungsmechanismen und Funktionen wirtsspezifischer Toxine (WALTON und PANACCIONE 1993).

Diese Problemstellung erfordert weitere Untersuchungen zur Funktion und Spezifität der pilzlichen Sekundärmetaboliten innerhalb des Pathosystems *Musa sp/Mf*, zu denen die vorliegende Arbeit einen Beitrag liefern soll. Der dabei verfolgte Ansatz schließt Methoden aus der Biotechnologie (Gewebekulturen), der Physiologie (enzymatische und metabolische Leistungen des Stoffwechsels beider Organismen) sowie der Biochemie und Phytopathologie (Interaktionen zwischen den Organismen und deren Produkten) unter Verwendung verschiedener *Musa cv* und mehrerer Isolate des Erregers *Mf* ein.

Auf diese Weise sollen folgende Zielsetzungen erreicht werden:

- Charakterisierung des **pflanzlichen Sekundärstoffwechsels** verschiedener *Musa cv* als Abwehrreaktion auf einen Befall mit dem Pathogen;
- Untersuchung des **pilzlichen Metabolismus** verschiedener *Mf*-Isolate unter Verwendung von Wirkstoffen zur Modifikation der pathogenetischen Eigenschaften unter *in vitro*-Bedingungen;
- Kritische Revision des Toxinpostulates im **Pathosystem *Musa sp/Mf*** und Bestimmung der Interaktionen im kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogenverhältnis.

Die Arbeit ist folgendermaßen gegliedert: Die Literaturübersicht (Kapitel 2) faßt die notwendigen Begriffsbestimmungen und Modellvorstellungen zu den Wirt-Pathogeninteraktionen zusammen und referiert die wissenschaftlichen Grundlagen der Komponenten des Pathosystems *Musa sp/Mf* mit besonderer Berücksichtigung der möglichen Resistenzmechanismen. Die zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen verwendeten Materialien und Methoden werden im anschließenden Kapitel 3 beschrieben, ein Nachweis der eingesetzten Geräte und Chemikalien erfolgt im Anhang. Die gewonnenen Ergebnisse werden textlich, graphisch und tabellarisch in Kapitel 4 dargestellt. In der Diskussion werden die in der Einleitung formulierten Fragen zur Funktion und Spezifität pilzlicher Sekundärmetaboliten im Pathosystem *Musa sp/Mf* einer kritischen Bewertung unterzogen. Eine Zusammenfassung erfolgt in Kapitel 6. Im Literaturverzeichnis (7) werden die ideellen sowie im Anhang (8) die materiellen Hilfsmittel der vorliegenden Arbeit dokumentiert.

2 Literaturübersicht

Phytopathosysteme bestehen aus pflanzlichen Wirten und ihren Krankheitserregern, deren Beziehung als antagonistische Symbiose bezeichnet wird (BAILEY 1983). Dabei kann die Entwicklung von Wirt-Pathogenkomplexen zwischen beiden an der Pathogenese beteiligten Komponenten als Co-Evolution charakterisiert werden (PARLEVLIET 1979), die auf einen zunehmenden Grad der Spezialisierung gerichtet ist und schließlich zu Gen-für-Gen-Beziehungen führt (FRANK 1992).

Die Bedeutung chemischer Faktoren bei der Interaktion wurde schon am Ende des 19. Jahrhunderts durch die Arbeiten von de Bary mit zellfreien Kulturfiltraten *Sclerotinia*-befallener Karotten erkannt (zit. n. GRANITI 1991); die Funktion von Toxinen in der Ätiologie ist dabei im Verlauf der Geschichte der Phytopathologie kontrovers geblieben (DALY 1987).

2.1 Begriffsbestimmungen und Modellsysteme

2.1.1 Pflanzeneigene Substanzen und Reaktionen

Pflanzen verfügen über verschiedene Abwehrmechanismen gegenüber biotischen Krankheitserregern, von denen als **Phytoalexine** die Substanzen bezeichnet werden, die *de novo* als Reaktion auf einen Angriff durch Pathogene synthetisiert werden und diese schädigen oder abwehren. Der Begriff faßt niedermolekulare, antimikrobielle Substanzen zusammen, die durch die Pflanzenzellen synthetisiert und nach Kontakt mit Mikroorganismen akkumuliert werden (DIXON 1986). Als sekundäre Pflanzenstoffe werden Phytoalexine über verschiedene Biosynthesewege gebildet, von denen der Phenylpropanweg zur Synthese von Flavonderivaten und der Mevalonsäureweg zum Aufbau von Terpenoiden die größte Bedeutung haben (BROOKS und WATSON 1991). Die aus verschiedenen Kulturpflanzen isolierten Phytoalexine sind oftmals in mehreren Arten derselben Gattung verbreitet und wirken gegen ein breites Spektrum biotischer Krankheitserreger (SMITH 1982, DIXON 1986).

Ein im Zusammenhang mit pflanzlichen Abwehrmechanismen auftretendes Phänomen wurde als **hypersensitive Reaktion (HR)** beschrieben: Diese Reaktion beinhaltet das schnelle und lokal begrenzte Absterben höherer Pflanzenzellen am Ort der Infektion und führt zu inkompatiblen Wirt-Pathogeninteraktionen (KEEN 1982, MANSFIELD 1986, COLLINGE et al 1994). Die HR richtet sich demzufolge vor allem gegen biotrophe Erreger, für die die Aufrechterhaltung funktionsfähiger Gewebe an der Infektionsstelle von ausschlaggebender Bedeutung ist für eine erfolgreiche Besiedlung des Wirtes (PANOPOULOS et al 1984). Obwohl der Zusammenhang zwischen HR und Resistenz evident ist, bleibt die Ursache-Wirkungsbeziehung zweifelhaft, da das Phänomen auch als Symptom für oder die Folge von anderen Resistenzmechanismen interpretiert werden kann (GABRIEL 1989, KEEN 1990, ATKINSON 1993, WALTON und PANACCIONE 1993).

2.1.2 Erregereigene Substanzen

Als **Toxin** wird in der Pflanzenpathologie nach einer Definition von WOOD (1967) eine Substanz bezeichnet, die Protoplasten von Pflanzen unabhängig von ihrer Herkunft oder chemischen Natur schädigt oder abtötet. Damit werden mikrobielle Produkte zusammengefaßt, die nicht-enzymatisch in geringen Konzentrationen schädigend auf Pflanzen wirken RUDOLPH (1976). Eine weitere Präzisierung erfolgte durch DURBIN (1983) und SCHEFFER und LIVINGSTON (1984), die als Toxine nur die Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels bezeichneten, die sichtbare Schäden am pflanzlichen Gewebe verursachen und in die Krankheitsentwicklung involviert sind (Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor).

Als **wirtsspezifisches Toxin (host-specific toxin, HST)** wird nach PRINGLE und SCHEFFER (1964) das metabolische Produkt eines pathogenen Organismus definiert, das nur dem Wirt des Pathogens gegenüber toxisch ist. Zur Berücksichtigung relativer Toxizitätsdosen zwischen anfälligen und resistenten Pflanzen schränkten DALY und KNOCH (1982) die Anwendung des Begriffes wirtsspezifisch auf die Toxine ein, deren Wirkung auf empfindliche Sorten zumindest eine Zehnerpotenz geringer ist als die erforderliche Konzentration für resistente Pflanzen. Eine weitere Bestimmung von DALY (1987) betrifft aufgereinigte Toxine mit hoher Wirksamkeit (10^{-7} bis 10^{-9} M) gegenüber anfälligen Pflanzensorten, deren Aktivität gegenüber resistenten Sorten 100 bis 10'000fach geringer ist.

In bezug auf die Bedeutung von HST in der Pathogenese sind zwei Kategorien definiert worden: Primäre Faktoren werden als essentiell für die qualitative **Pathogenität** angesehen, während sekundäre Faktoren zur quantitativen **Virulenz** beitragen (WHEELER 1981, DURBIN 1983). Beispiele für Toxine als Pathogenitätsfaktoren sind PC-Toxin (*Periconia circinata* in Sorghum) und Victorin (*Cochliobolus victoriae* in Hafer), als Virulenzfaktoren sind HMT-Toxin (*Cochliobolus heterostrophus* Rasse T in Mais) und mehrere unspezifisch wirkende Toxine kategorisiert worden (YODER 1981, WHEELER 1981)

Im Zusammenhang mit der pflanzlichen Reaktion auf einen pathogenen Angriff ist der Begriff **biotischer Elizitor** für diejenigen Substanzen aus dem pilzlichen Metabolismus definiert worden, die typische Abwehrreaktionen der Pflanze im inkompatiblen Verhältnis zu induzieren in der Lage sind (EBEL und SCHEEL 1992, KOGEL und BEIßMANN 1992). Elizitoren können Reaktionen unspezifisch in einem breiten Wirtsspektrum oder spezifisch nur in den Pflanzen hervorrufen, die durch das betreffende Pathogen befallen werden (YOSHIKAWA 1983, YOSHIKAWA et al 1993): Unspezifische Elizitoren sind unter anderem als Glycoproteine (MW > 42'000 Da), Polypeptide (MW > 3000 bis 8000 Da) und Proteine (MW ~ 10'000 Da) charakterisiert worden (EBEL und SCHEEL 1992); wirtsspezifische Elizitoren sind bisher nur von einigen pflanzenpathogenen Viren und je einem bakteriellen und pilzlichen Erreger bekannt (KEEN und DAWSON 1992, KOGEL und BEIßMANN 1992). In Übereinstimmung mit dem Modell zur Spezifität inkompatibler Wirt-

Pathogeninteraktionen (siehe Abschnitt 2.1.3) werden spezifische Elizitoren als Produkte der Avirulenzgene des Erregers angesehen (YOSHIKAWA 1983).

Zur Charakterisierung von pilzlichen Metaboliten, die die pflanzlichen Abwehrmechanismen unterdrücken, ist der Begriff **Suppressor** definiert worden (BEIßMANN und KOGEL 1992). Damit werden nach OKU et al (1980) Substanzen bezeichnet, die bestimmende Faktoren der Pathogenität sind, ohne sichtbare Symptome von Phytotoxizität hervorzurufen. Zur weiteren Bestimmung werden folgende Eigenschaften genannt (SHIRAISHI et al 1994): (1) Produkte des Pathogens, (2) Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr und Induktion lokaler Anfälligkeit in Wirtspflanzen, (3) Wirtsspezifität und (4) Nicht-Toxizität gegenüber Pflanzenzellen. Nach COLLINGE et al (1994) ist die Unterscheidung zwischen Suppressoren und Toxinen allerdings „subtle“, da beide die pflanzlichen Abwehrprozesse blockieren; allerdings sind Suppressoren nicht in der Lage, Krankheitssymptome hervorzurufen. Substanzen mit den genannten Eigenschaften sind in mehreren kompatiblen Pathosystemen mit biotrophen und/oder langsam wachsenden nekrotrophen Erregern gefunden worden (*Cladosporium fulvum*, *Mycosphaella spp.*, *Phytophthora spp.*) und als Glucane oder Glycopeptide identifiziert worden (BEIßMANN und KOGEL 1992, SHIRAISHI et al 1994).

2.1.3 Wirt-Pathogenkomplex: Modellvorstellungen und Referenzsysteme

Höhere Pflanzen werden ständig von einer Vielzahl von Mikroorganismen kontaktiert, von denen jedoch nur eine vergleichsweise geringe Zahl zur Infektion und damit Auslösung von Krankheiten in der Lage ist (PANOPOULOS et al 1984, GABRIEL und ROLFE 1990); diese Form der Resistenz gegenüber nichtpathogenen Organismen wird als **allgemeine, Nichtwirts- oder Basisresistenz** bezeichnet (HEATH 1980, NIKS 1988) und ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die **(Basis-) Kompatibilität** bzw. **Anfälligkeit** einer Pflanze gegenüber einem Erreger wird als die Fähigkeit eines Mikroorganismus definiert, sich auf einem gegebenen Wirt zu ernähren und zu reproduzieren; das Verhältnis zwischen beiden Organismen wird als **homologe Interaktion** bezeichnet (GABRIEL und ROLFE 1990).

Demgegenüber wird als **heterologe Interaktion** die **(spezifische) Inkompatibilität** bzw. **Resistenz** als Produkt aktiver Erkennungs- und Abwehrmechanismen zwischen Wirtspflanze und Pathogen beschrieben (GABRIEL und ROLFE 1990).

Die **Spezifität** zwischen pflanzlichen Wirten und deren mikrobiellen Pathogenen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen ist innerhalb der Phytopathologie ein weiterhin kontrovers diskutiertes Thema, das zeitweise die Qualität eines Paradigmenstreites erreicht hatte (VANDERPLANK 1986, KERR 1987, VANDERPLANK 1991, JOHNSON und KNOTT 1992), bei dem es um das Erbe der durch Flor formulierten **Gen-für-Gen-Hypothese** ging: Diese basierte auf der genetischen Analyse des Leinrostes und postulierte das Vorhandensein komplementärer Gene für

Resistenz in der Pflanze sowie für Pathogenität im Erreger (FLOR 1971). Diese Hypothese ist von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich interpretiert und mit Ergebnissen aus mehreren Pathosystemen experimentell belegt worden (BAILEY 1983, De Wit 1986, Gabriel 1989, GABRIEL und ROLFE 1990, KOHMOTO und OTANI 1991):

- (1) Biochemische und physiologische Untersuchungen zur pflanzlichen Abwehr durch HR oder Phytoalexine ermittelten genotyp-spezifische Interaktionen zwischen Wirtssorten und Pathotypen in heterologen Pathosystemen mit fakultativ biotrophen oder nekrotrophen Erregern. Dabei korrespondieren spezifische Elizitoren als Produkte der zumeist dominanten Avirulenzgene des Pathogens einerseits mit spezifischen Rezeptoren als Produkte der Resistenzgene in der Pflanze andererseits mit der Folge einer inkompatiblen Wirtsreaktion. Experimentelle Befunde aus dem Pathosystem Sojabohne/*Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* führten zur Beschreibung des (spezifischen) **Elizitor-Rezeptor-Modelles** durch KEEN (1982).
- (2) Genetische Untersuchungen in homologen Wirt-Pathogeninteraktionen, meist mit biotrophen Erregern, fanden genotyp-spezifische Beziehungen bei der Unterdrückung pflanzeigener Abwehrmechanismen durch Suppressoren des Pathogens. Die gemäß der Gen-für-Gen-Hypothese korrespondierenden Faktoren sind demzufolge spezifische Suppressorsubstanzen als Produkte der Pathogenitäts- oder Virulenzgene einerseits mit entsprechenden Rezeptoren auf pflanzlicher Seite andererseits, in deren Folge kompatible Wirt-Pathogenverhältnisse entwickelt werden. Spezifische **Suppressor-Modellsysteme** sind von DOKE et al (1982) basierend auf Untersuchungen des Pathosystems Kartoffel/*Phytophthora infestans* sowie von SHIRAIISHI et al (1994) bei Erbse/*Mycosphaerella pinodes* entworfen worden.
- (3) Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wirkung von HST in kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogenbeziehungen mit nekrotrophen Erregern können als eine dritte mögliche Interpretation der Gen-für-Gen-Hypothese aufgefaßt werden, da die hohe Wirtsspezifität das Vorhandensein spezifischer Zielstrukturen in der Pflanze wahrscheinlich macht (VANDERPLANK 1986). Anders als bei den unter (1) und (2) beschriebenen Interaktionen findet die Erkennungsreaktion hier jedoch zwischen den HST als den Produkten der Pathogenitäts- bzw. Virulenzgene sowie pflanzlichen Rezeptoren statt, deren Sensitivität über das weitere Verhältnis zwischen Wirt und Erreger entscheidet (GABRIEL 1989). Obwohl die genetische Basis der Toxinproduktion in einigen Fällen aufgeklärt wurde (ELLINGBOE 1976, YODER et al 1989, KOHMOTO und OTANI 1991), ist die Beziehung zwischen diesen und den pflanzeigenen Genen zur Erkennung bzw. Abwehr noch weitgehend unbekannt (BUIATTI und INGRAM 1991). Der bisher einzige experimentelle Beleg für eine direkte Interaktion zwischen HST und pflanzlichen Strukturen ist von MEELEY et al (1992) im Pathosystem Mais/*Cochliobolus carbonum* gefunden worden, in dem HC-Toxin des Erregers in resistentem Hm-Mais durch HC-Toxinreduktase (HCTR) detoxifiziert wird; allerdings ist HCTR inzwi-

schen auch in anderen Pflanzenarten, die nicht zum Wirkkreis von *C. carbonum* gehören, gefunden worden (HAN et al 1997).

Abschließend ist die Einschätzung von DE WIT (1986) affirmativ zu zitieren: „Models such as those discussed above are important in providing a stimulus for further experimentation, but there is a danger that they channel thinking in a single direction.“

2.2 Wirtspflanze *Musa sp*

Der übergeordnete Begriff Banane wird in der vorliegenden Arbeit für Pflanzen der Gattung *Musa* verwendet, die in tropischen und subtropischen Klimaten als Dessert- („banana“) und Kochbanane („plantain“) angebaut werden. Ihr Genom bildet das Produkt einer interspezifischen Hybridisierung aus *Musa acuminata* Colla (Genom A) und *Musa balbisiana* Colla (Genom B), die teilweise als *Musa paradisiaca* zusammengefaßt werden (REHM und ESPIG 1984, STOVER und SIMMONDS 1987). Die taxonomische Einordnung der Pflanzen, die Bestandteile beider Genome umfassen, ist in Tabelle 1 dargestellt. Im folgenden wird mit *Musa sp* pflanzliches Material aller Genomgruppen und mit *Musa cv* der konkrete Bezug auf bestimmte Sorten (*cultivars*) bezeichnet. Die bisherige, auf morphologischen Charakteristika beruhende taxonomische Klassifizierung ist durch neuere Untersuchungen des Enzym-polymorphismus (Isozyme), sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (z. B. Flavonoide) und molekularer Marker (nukleare und chloroplastidäre DNA-RFLP, RAPD) um chemotaxonomische Parameter erweitert und in den Grundzügen bestätigt worden (JARRET und GAWEL 1995).

Im Hinblick auf den Gegenstand der vorliegenden Untersuchung sind als gemeinsame Merkmale der kultivierten Bananen Parthenokarpie, weibliche und männliche Sterilität und Triploidie hervorzuheben, die zur Konservierung unveränderter Phänotypen geführt haben (STOVER und SIMMONDS 1987, GONZÁLEZ DE LEÓN und FAURÉ 1993, PRICE 1995). Die Bananen-züchtung beruht in ihrer klassischen Form daher auf der Verwendung diploider Wildsorten zur Rekombination triploider kultivierter Bananen, die wiederum gametensteril sind und durch vegetative Verfahren vermehrt werden müssen (ORTIZ 1995).

Nach ISRAELI et al (1995) geht die *in vitro*-Kultur von *Musa sp* auf Versuche zurück, die sehr geringe Keimfähigkeit von Samen zu überwinden. Die Verbreitung des Kürbismosaikvirus (CMV) sowie der Panamakrankheit (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) in Bananenpflanzungen Südostasiens führte zur Entwicklung von Gewebekulturtechniken, die die Produktion erregerefreien Pflanzmaterials zum Ziel hatte. Seit Mitte der 80er Jahre ist die Vermehrung und Regeneration von *Musa sp* durch „micropropagation“ eine in steigendem Umfang angewandte Technologie, die von ihren Anfängen in triploiden homozygotischen Sorten der Untergruppe Cavendish auf weitere Bananenarten und -sorten ausgedehnt worden ist (BANERJEE und DE LANGHE 1985, VUYLSTEKE 1989). Als Vorteile der *in vitro*-Kultur werden vor allem

ökonomische und anbautechnische, darunter insbesondere die Pflanzenquarantäne gegenüber tierischen und mikrobiellen Schaderregern, genannt (ISRAELI et al 1995).

In bezug auf die wissenschaftliche Forschung sollen hier beispielhaft die Arbeiten zur Etablierung von Kalluskulturen (MEGIA et al 1992, 1993) und Zellsuspensionen (DHED'A et al 1991, PANIS et al 1993), zum Problem somaklonaler Variationen (NOVAK et al 1989, ESCALANT und TEISSON 1993), zur Möglichkeit molekularbiologischer Charakterisierung des Genoms (JARRET und GAWEL 1995) sowie die sich mit der Herstellung transgener *Musa*-Pflanzen (SAGI et al 1994, 1995) befaßten Arbeiten erwähnt werden. Bei allen genannten Arbeits- und Autorengruppen ist allerdings eine Konzentration der experimentellen Untersuchungen auf einige wenige Sorten (aus der besonders geeigneten Genomgruppe ABB) oder sogar auf eine einzige Sorte (z. B. Bluggoe, ABB) festzustellen, die die Übertragbarkeit der Methoden und Ergebnisse auf weitere Fragestellungen einschränken (CRONAUER und KRIKORIAN 1983, DHED'A et al 1991, MEGIA et al 1993). In diesem Zusammenhang ist auch die Gründung des International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP, Montpellier/Frankreich) im Jahre 1985 zu erwähnen, die die zunehmende Bedeutung der angewandten Forschung deutlich macht (BUDDENHAGEN 1993).

Der Einsatz von *in vitro*-Kulturtechniken in der Bananenproduktion und angewandten Forschung wird durch zwei Faktoren begrenzt: (1) das Auftreten somaklonaler Variationen (ISRAELI et al 1995); (2) die sehr geringe somatische Embryogenese in Zellsuspensionen und der geringe Grad an Embryogenie in undifferenzierten Zellverbänden (NOVAK et al 1989).

(1) Als somaklonale Variationen werden nach ISRAELI et al (1995) diejenigen „off-type“-Abweichungen vom pflanzlichen Ausgangsmaterial verstanden, deren Phänotyp anhaltend und vererbbar ist. Die beiden häufigsten Formen bilden Zwergwüchsigkeit („dwarfism“, 75 % aller aufgetretenen Veränderungen) und verschiedene Blattanomalien mit häufiger Gelbstreifung („mosaic virus like“, 24 %), von denen sich die letztgenannte stark auf den Fruchtertrag auswirkt (REUVENI 1990). Die Ursachen für diese Veränderungen können sowohl in der Expression schon angelegter Merkmale als auch in der *de novo*-Variation durch unbestimmte genetische Mechanismen liegen (ISRAELI et al 1995). Dazu gehören nach WITHERS (1993) Veränderungen in der Ploidie, der Chromosomenzahl und -struktur sowie einzelner DNA-Basenpaare. Das Ausmaß somaklonaler Variationen in den verschiedenen *Musa* cv und -Genomgruppen folgt keinem mit dem Genotyp assoziierten Muster und reicht von 0 % bei der Sorte Saba (ABB) bis zu 93.4 % bei Figue Sucree (AA); innerhalb derselben Sorte variieren die Angaben je nach Kulturbedingungen und Kriterien der Erkennung, z. B. werden für Grande Naine (AAA) von verschiedenen Autoren Werte zwischen 2.0 und 63.3 % angegeben (zit. n. ISRAELI et al 1995). Die am häufigsten beschriebenen Veränderungen können erst im Laufe der *ex vitro*-Entwicklung erkannt werden (ISRAELI et al 1995). Zum frühestmöglichen Nachweis von Zwergwüchsigkeit wird ein Zusatz von Gibberillinsäure zum Nährmedium vorgeschlagen, auf den somaklonal unveränderte Pflanzen mit rascher Verlängerung des

Pseudostammes und verminderter Blattbildung reagieren (REUVENI 1990). Grundsätzlich werden undifferenzierte Zellverbände als mögliche Quelle somaklonaler Variationen angesehen, so daß zur Vermeidung oder Verminderung des Risikos eine möglichst kurze Kallusphase bzw. die direkte Embryogenese angestrebt wird (PANIS und SWENNEN 1993).

(2) Die experimentelle Handhabung uniformer Zellen und die anschließende Regeneration vollständiger *Musa*-Pflanzen wird durch die Redifferenzierung einzelner Zellen zu Schößlingen (Organogenese) bzw. zu pflanzlichen Embryos (somatische Embryogenese) ermöglicht (ESCALANT und TEISSON 1993). Insbesondere die Bestimmung von toxischen Dosen pathogener Metaboliten und Methoden des Resistenz-screenings haben zur Entwicklung von entsprechenden Versuchsprotokollen geführt (JONES 1990, GALUN und BREIMAN 1992, BRAZOLOT et al 1994). Die Anwendung auf verschiedene *Musa* cv führte jedoch nur zu sehr geringen Regenerationsraten: NOVAK et al (1989) erreichten 12 % somatischer Embryos aus Zellsuspensionen bei der Sorte Bocadillo (Genom AA), und DHEDA et al (1991) konnten bei der Kochbananensorte Bluggoe (ABB) durch Modifizierung der Wachstoffsstoffkonzentrationen 10 bis 14.5 % der eingesetzten Kalli zu intakten Pflanzen regenerieren. Obwohl die möglichen Anwendungen embryogener *Musa*-Zellsuspensionen weiterhin optimistisch eingeschätzt werden (PANIS und SWENNEN 1993), steht derzeit kein hinreichend entwickeltes oder adaptierbares Versuchssystem zur Verwendung embryogener Zellkulturen verschiedener *Musa* cv zur Verfügung, das im Hinblick auf phytopathologische Fragestellungen anwendbar wäre.

Insgesamt läßt sich für die Voraussetzungen der vorliegenden Untersuchung das Fazit von NOVAK et al aus dem Jahre 1989 aufrechterhalten: „... species of the genus *Musa* are extraordinarily recalcitrant since even «simple» *in vitro* techniques such as establishment of callus and cell suspension cultures have met with very limited success.“ Gleichzeitig stellt aber die Meristem- oder Gewebekultur („micropropagation“) die nach wie vor einzig sichere Methode zur Vermehrung und Regeneration von *Musa*-Pflanzen bei minimaler Gefahr somaklonaler Variationen dar (VUYLSTEKE 1989).

Im Hinblick auf den natürlichen Infektionsvorgang durch *Mf* (siehe Kapitel 2.3) ist die *Musa* cv-Blattarchitektur von Bedeutung: Nach SALLÉ et al (1990) besteht die Blattspreite aus der subkutikulären Epidermis, an die sich die Hypodermis mit stark vakuolisierten Zellen anschließt; das Mesophyll besteht aus dem ein- bis zweischichtigen Palisadenparenchym und dem darunterliegenden Schwammparenchym mit sehr großen Interzellularräumen.

Die Stomatadichte beträgt auf der adaxialen Blattseite zwischen 0.4 und 9.6, auf der abaxialen Oberfläche zwischen 23 und 51.3 Stomata cm^{-2} (VASQUEZ et al 1990). Zwischen verschiedenen Sorten wurden keine anatomischen Unterschiede im Blattaufbau gefunden (MOURICHON et al 1990, VASQUEZ et al 1990). Nach einer Untersuchung von ZEWELDU (1996) verfügt die Sorte Yangambi km 5 über weniger Stomata auf der Blattober- und -unterseite als

Grande Naine und Giant Cavendish, der Autor leitet jedoch keine ursächliche Beziehung zur Reaktion gegenüber *Mf* ab.

Biochemische Untersuchungen über die Inhaltsstoffe in verschiedenen Kompartimenten des Bananenblattes (Symplast, Apoplast, Leitbündel mit Phloem und Xylem) liegen bisher nicht vor. Pflanzen der Gattung *Musa* verfügen über Latexkanäle in den Leitbündeln, die neben anorganischen Salzen auch Spuren von Zuckern und Aminosäuren enthalten (BAKER et al 1990); die hohe Viskosität der an Blattschnitten austretenden Flüssigkeit erschwert dadurch die Gewinnung anderer Inhaltsstoffe, insbesondere aus dem für die Ernährung von *Mf* bedeutenden Interzellularraum.

Auf Leistungen des Primär- und Sekundärstoffwechsels, die mit der möglichen Reaktion auf Schaderreger und insbesondere pilzliche Pathogene im Zusammenhang stehen, wird in Abschnitt 2.4 eingegangen.

Tab. 1 Taxonomische Klassifikation von *Musa sp* (STOVER und SIMMONDS 1987, STRASBURGER 1991) und *Mf* (STOVER 1980, AGRIOS 1988, PONS 1990, CARLIER et al 1993, HOFFMANN et al 1994)

<i>Musa sp</i>	Taxon	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
Plantae	Reich	Mycotae
Spermatophyta	Abteilung	Eumycota
Angiospermae	Unterabteilung	Ascomycotina anamorph: Deuteromycotina
Monocotyledonae	Klasse	Loculoascomycetes anamorph: Hyphomycetes
Liliidae	Unterklasse	Euascomycetidae
Zingiberales	Ordnung	Dothideales
Musaceae	Familie	
Eumusa	Sektion	
<i>Musa</i>	Gattung	<i>Mycosphaerella</i> , anamorph: <i>Paracercospora</i>
<i>acuminata</i> , <i>burmannica</i> , <i>paradisiaca</i> LINNAEUS	Art	<i>fijiensis</i> MORELET (anamorph: DEIGHTON)
AAA, AAB, ABB, AB	Gruppe	
Cavendish, Plantain, Bluggoe	Untergruppe	
Yangambi km 5, Horn, Cachaco	Varietät/Isolat	309, 745, 750, CAM, HON, NIG

2.3 Pathogen *Mycosphaerella fijiensis*

Mycosphaerella fijiensis (*Mf*) Morelet als Erreger der Schwarzen Sigatokakrankheit wurde 1963 erstmalig beschrieben (STOVER 1978, 1980). Die taxonomische Klassifizierung der Teleo- und Anamorphen ist Tabelle 1 zu entnehmen. Es werden zweizellige Ascosporen in Perithezien und Spermatien in Spermogonien gebildet. Die Anamorphen bilden 5- bis 11-fach septierte,

zwischen 30 und 150 µm lange, leicht gebogene und hyaline Konidien an Sporodochien (AGRIOS 1988, STOVER 1980, NATURAL 1990, PONS 1990). Eine in Mittelamerika isolierte und zunächst als *Mf* var. *difformis* Mulder und Stover (STOVER 1980) beschriebene Unterart ist inzwischen als identisch mit *Mf* taxonomisch eingeordnet worden (CARLIER et al 1993, 1994). Bisher sind keine physiologischen Rassen oder Pathotypen des Pilzes beschrieben worden; die Untersuchungen wurden in der Regel mit frischen Isolaten aus Ascosporen durchgeführt, die in natürlich befallenen Beständen gewonnen wurden (FULLERTON und OLSEN 1991). Das Myzel besteht aus septierten Hyphen mit verdickten Nahtstellen und mehrkernigen, vakuolisierten Zellen (NATURAL 1990, SALLÉ et al 1990). Nach CARLIER et al (1993, 1994) ist *Mf* polymorph und heterothallisch und verfügt über nur 2 % repetitiver DNA.

Die *in vitro*-Kulturbedingungen werden nach JACOME et al (1991) und JACOME und SCHUH (1993) folgendermaßen angegeben: Die Konidienkeimung erreicht bei einer Optimumtemperatur von 25°C und dem Vorhandensein von freiem Wasser innerhalb von 24 Stunden Werte von annähernd 100 %. Die Sporulation auf künstlichen Nährböden erreichte ihr Maximum bei 20°C und 2.5 W m⁻² Dauerlicht. Unter *in vitro*-Bedingungen wird das sexuelle Stadium nur selten erreicht, die Konidienbildung ist nur in sehr geringem Maße induzierbar und wird nach wiederholtem Nährboden-Transfer vollständig verloren (JEGER et al 1995, JONES 1995). Das Keimschlauchwachstum aus Ascosporen erreicht bei einer Optimumtemperatur von 28.0°C und einer annähernd 100 %igen Luftfeuchte etwa 50 µm nach 24 Stunden (STOVER 1980).

Als heterotropher Organismus verfügt *Mf* über einen Primärstoffwechsel, der von der Nutzung externer Kohlenstoffquellen abhängig ist. Unter *in vivo*-Bedingungen ist die Ernährung zunächst biotroph im Apoplasten der Wirtspflanze; etwa drei bis vier Wochen nach Inokulation tritt in kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen eine zunehmende Nekrotisierung von Blattgewebe auf, die mit der nekrotrophen Ernährung des Pilzes in Verbindung gebracht wird (SALLÉ et al 1990, BEVERAGGI et al 1993). Unter Kulturbedingungen ist der Pilz in der Lage, Nährböden unterschiedlicher Komplexität zum vegetativen Wachstum zu nutzen; als Kohlenstoffquelle wurden Stärke, Saccharose, Glucose und Maltose eingesetzt (NATURAL 1990, OKOLE 1995).

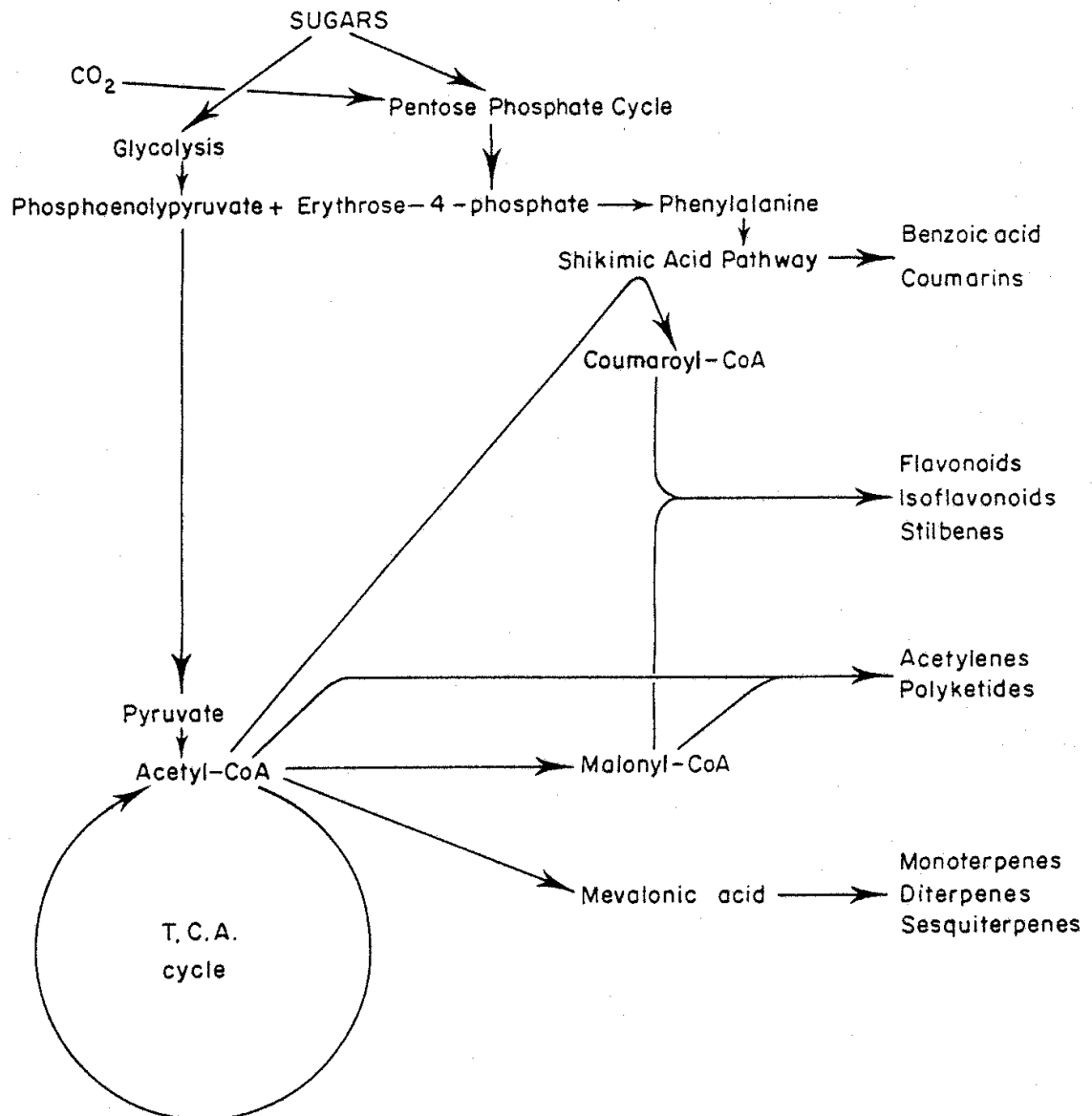


Abb. 1 Primärstoffwechsel der Pflanze und Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten in pflanzlichen und pilzlichen Organismen (MANSFIELD 1983)

Die Pigmentierung des Myzels verschiedener *Mf*-Isolate und die Ausbeute extrahierbarer Substanzen ist unter *in vitro*-Bedingungen in starkem Maße abhängig von den eingesetzten Nährmedien und den Faktoren Temperatur und Licht (NATURAL 1990). In Flüssigkulturen mit modifiziertem M-1D-Medium unter einem Hell-/Dunkelrhythmus von jeweils zwölf Stunden wurde nach 28 Tagen Inkubationsdauer eine Rohextrakt-Ausbeute von 25 mg l⁻¹ von UPADHYAY et al (1990) angegeben, unter vergleichbaren Bedingungen betrug diese nach STIERLE et al (1991) 90 mg l⁻¹. Aus den Rohextrakten wurden verschiedene Substanzen gewonnen und charakterisiert: UPADHYAY et al (1990) isolierten das erstmalig beschriebene Fijinsin (C₁₈H₁₆O₆) mit heterocyclischen C₅- und C₆-Ringen. STIERLE et al (1991) konnten sechs Substanzen aus extrahierten Kulturfiltraten von *Mf* bestimmen, von denen einige als Metaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges höherer Pilze bekannt waren. In diesem auch als Acetat-Polymalonatweg bezeichneten Metabolismus werden aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA

Polyketosäuren synthetisiert, die durch 1,6-Acylierung zu zyklischen Pentaketiden metabolisiert werden; verschiedene Naphto- und Hydrochinone sind als Zwischen- und Endprodukte des sekundären Stoffwechsels für die Melaninbiosynthese von Bedeutung (HEß 1970, STOESSL 1981, GREENBLATT und WHEELER 1986, STIERLE et al 1991).

Der pilzliche Pentaketid-Biosyntheseweg mit den hypothetischen Wirkorten des Hemmstoffes Tricyclazol[®] ist in folgender Abbildung zusammengefaßt.

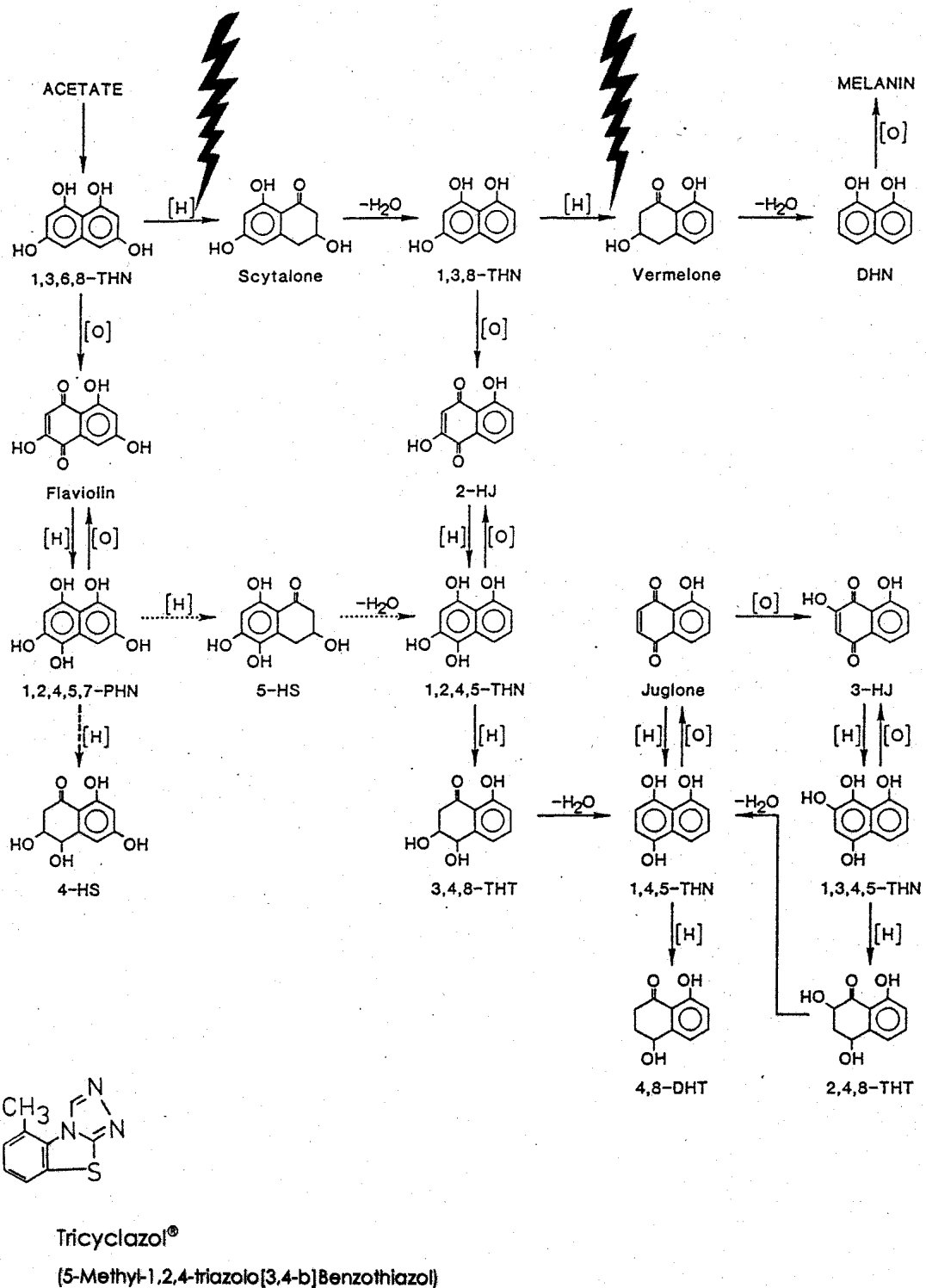


Abb. 2 Acetat-Polymalonat-Biosyntheseweg von Hydro- und Naphtochinonen (WHEELER und STIPANOVIC 1985), Struktur (BUCHENAUER 1990) und hypothetische Wirkzentren (rote Pfeile) des Melaninhemmstoffes Tricyclazol® (TOKOUSBALIDES und SISLER 1979, VIVIANI et al 1993); weitere Angaben im Text

Im Zusammenhang mit der Bedeutung des Melanins für die Pathogenität verschiedener human- und phytopathogener Pilze ist der Pentaketid-Biosyntheseweg von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden: BELL et al (1976) und STIPANOVIC und BELL (1977) analysierten den Gehalt an Pentaketid-Metaboliten in melanindefizienten Mutanten von *Verticillium dahliae* und erkannten die zentrale Rolle des Scytalins für die Melaninbiosynthese. TOKOUSBALIDES und SISLER (1979) untersuchten den Einsatz des spezifischen Wirkstoffes Tricyclazol® [5-Methyl-1,2,4-Triazolo-(3,4-b)-Benzothiazol], der im Reisanbau als Fungizid gegen *Pyricularia oryzae* eingesetzt wird: Nach Zugabe von 10 ppm Tricyclazol® wurde eine mehrfache Steigerung von Flaviolin, Scytalon und 2-Hydroxyjuglon in Kulturen von *Verticillium dahliae* festgestellt, der Gehalt an Vermelon nahm dagegen stark ab. Diese Ergebnisse legen eine Hemmung des Pentaketid-Metabolismus sowohl bei der Reduktion von 1,3,8-Trihydroxynaphtalin zu Vermelon als auch von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalin zu Scytalon nahe, so daß ein größerer Teil zu Flaviolin oxidiert werden kann. In Untersuchungen mit Albinomutanten von *Wangiella dermatitidis* wurde eine Hemmung des Reduktionsschrittes von 3-Hydroxyjuglon zu 2,4,8-Trihydroxytetralon bei Zugabe von 42.4 µM Tricyclazol® festgestellt (WHEELER und STIPANOVIC 1985). Eine komparative Studie von WHEELER (1983) mit 26 Pilzarten aus 16 Gattungen zeigt die weite Verbreitung des Pentaketid-Biosyntheseweges innerhalb der Asco- und Deuteromycotina.

Nach VIVIANI et al (1993) wirkt Tricyclazol® als spezifischer Hemmstoff der Reduktasen, die innerhalb des Pentaketid-Metabolismus die beiden Substanzen 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalin und 1,3,8-Trihydroxynaphtalin zu Scytalon bzw. Vermelon reduzieren und damit die Melaninbildung unterdrücken; beide Enzyme sind abhängig von NADPH, das ebenfalls reversibel von Tricyclazol® gehemmt wird. Durch eine Akkumulation der entsprechenden Zwischenprodukte ist nach STIERLE et al (1991) eine verstärkte Metabolisierung der bei *Mf* gefundenen Pentaketide und eine Akkumulation von 2,4,8-Trihydroxytetralon (2,4,8-THT) zu erwarten.

Obwohl keine spezifischen Untersuchungen über die biochemischen Leistungen von *Mf* vorliegen, kann davon ausgegangen werden, daß der Pilz als Ascomycet über eine Zellwand aus Chitin (β -1,4-*N*-Acetylglucosamin) und Cellulose (β -1,4-Glucan) oder β -1,3- und β -1,6-Glucanen verfügt (CLARKSON 1992); nach LEPOIVRE et al (1993) kann die Aktivierung hydrolytischer Enzyme der Wirtspflanze *Musa sp* (Chitinasen, Glucanasen) zur Aktivierung pilzlicher Elizitoren und der Lyse von Hyphenenden führen. Über das Vorhandensein von Enzymen zur Auflösung pflanzlicher Zellwände (Cutinasen, Pektinasen, Zellulasen) liegen keine Angaben vor. Die Membranen von Zellen und deren Kompartimenten enthalten Ergosterol und sind somit sensitiv gegenüber systemischen Fungiziden wie Triazolen, Imidazolen, Pyrimidinen (Hemmung der Cytochrom P-450 Monooxygenase) und Morpholinen (Hemmung spezifischer Reduktase und Isomerase der Ergosterol-Vorstufen) (CRONSHAW und AKERS 1990, SHILLINGFORD 1990). Weitere Aspekte zur Ernährung und Verbreitung des Pilzes, die in direktem Zusammenhang mit der Wirtspflanze *Musa sp* stehen, werden im folgenden Kapitel zur Schwarzen Sigatokakrankheit ergänzt.

2.4 Pathosystem *Musa sp/Mf*

2.4.1 Evolution

Die Schwarze Sigatokakrankheit (black Sigatoka disease, black leaf streak) wurde erstmalig 1963 in Fiji beschrieben (STOVER 1980, STOVER und SIMMONDS 1987, JEGER et al 1995). Bis dahin wurden alle Blattfleckensymptome der Banane als Gelbe Sigatokakrankheit (yellow Sigatoka disease) mit dem Erreger *Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder in Verbindung gebracht. Eine Revision des in Herbarien konservierten Blattmaterials führte zur Identifikation von *Mf* auf Acquisitionen aus dem Jahre 1927 in Taiwan und 1957 in Papua Neuguinea und den Salomon-Inseln (STOVER 1978).

Mf befällt alle Sorten der für die Produktion von Dessertbananen wichtigsten *Musa*-Untergruppe Cavendish (Genom AAA), die in den 30er Jahren zur Bekämpfung des Erregers der Panamakrankheit *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* die bis dahin dominierende Gros Michel ersetzt hatten (JEGER et al 1995); zu derselben Genomgruppe gehört die Sorte Yangambi km 5 (Untergruppe Ibota), die als hochgradig resistent gegenüber *Mf* bekannt ist, allerdings im praktischen Anbau keine Rolle spielt. Die geographische Ausbreitung der Schwarzen Sigatokakrankheit erfolgte über folgende Stationen (STOVER 1978, MOURICHON und FULLERTON 1990, JEGER et al 1995): In Asien wurde 1980 das südchinesische Festland und 1981 die Cape York-Halbinsel im Norden Australiens erreicht. In Westafrika erfolgte die Ausbreitung von Gabun (1978) bis zur Elfenbeinküste (1985), in Zentral- und Ostafrika wurden erste Funde in Ruanda (1986) und Sansibar (1987) gemeldet. In Lateinamerika breitete sich der Erreger zwischen Honduras (1972) und den Bananenanbaugebieten im Norden Südamerikas (Ecuador 1989, Venezuela 1992) aus, in der Karibik ist bisher nur auf Kuba (1992) ein erster Befund dokumentiert worden. In allen Gebieten war bis zum angegebenen Zeitpunkt die Gelbe Sigatokakrankheit vorherrschend, deren Erreger *Mycosphaerella musicola* innerhalb weniger Jahre durch *Mf* zurückgedrängt worden ist, ohne jenen allerdings vollständig zu ersetzen (JEGER et al 1995, MOULIOM-PEFOURA et al 1996). Die Ergebnisse einer RFLP-Analyse von 57 *Mf*-Isolaten aus verschiedenen Anbaugebieten der Welt unterstützen die Hypothese über den Ursprung des Erregers in Südostasien (CARLIER et al 1994), wo ebenfalls das Genzentrum der Wirtspflanze *Musa sp* angenommen wird (STOVER und SIMMONDS 1987).

2.4.2 Infektion und Trophie

Die Ascosporen als wichtigste natürliche Inokulumquelle werden auf der Unterseite der Wirtsblätter bei hoher Feuchtigkeit aus den Perithezien ausgeschleudert und über weite Strecken mit dem Wind disloziert (AGRIOS 1988); sie können acht Wochen im Schatten überleben (STOVER 1980). Für die Ausbreitung im Bestand und die sekundäre Infektion sind vor allem Konidien verantwortlich, die in jahreszeitlichen Rhythmen bei hoher Feuchtigkeit gebildet werden (AGRIOS 1988). Die Penetration der pflanzlichen Epidermis durch sexuell und asexuell gebildete Sporen erfolgt ausschließlich durch die Stomata, deren Dichte auf der

Blattunterseite deutlich höher ist; Appressorien werden nicht gebildet (STOVER 1980, VASQUEZ et al 1990).

Die weitere Ausbreitung des Myzels innerhalb der Wirtspflanze findet interzellulär im substomatären Raum statt, ohne das pflanzliche Gewebe zunächst zu beeinträchtigen (BEVERAGGI et al 1993). Es werden keine Haustorien gebildet (SALLÉ et al 1990). In dieser Phase eignet sich der Pilz mit Hilfe seines weitverzweigten Myzels die im Apoplasten vorhandenen Nährstoffe, insbesondere Kohlenhydrate und Mineralstoffe, an. Inwieweit der von ATKINSON (1993) beschriebene pilzliche Mechanismus der Veränderung des Protonentransportes durch das pflanzliche Plasmalemma und ein dadurch gesteigerter Nährstoff-Efflux aus dem Cytosol in den Apoplasten eine Rolle spielt, ist bei *Musa sp/Mf* bisher nicht untersucht worden. Die Wirtszellen in kompatiblen Interaktionen zwischen *Mf* und *Musa sp* bleiben bis zu 28 Tage nach Inokulation intakt, erst danach ist eine fortschreitende Plasmolyse der Zellen und die Degeneration der Plastiden zu beobachten: Die parenchymatischen und epidermalen Zellen des pflanzlichen Organismus kollabieren in zunehmendem Maße und ermöglichen damit die vollständige Nutzung der cytosolischen Komponenten durch den Pilz. Die typischen Symptome der Schwarzen Sigatokakrankheit (siehe folgenden Abschnitt) sind Ausdruck des kompatiblen Wirt-Pathogenverhältnisses, der Mechanismus der resistenten *Musa cv* gegenüber dem Pilz in inkompatiblen Interaktionen ist mit der hypersensitiven Reaktion verbunden (SALLÉ et al 1990, BEVERAGGI et al 1993). Der Verlauf der Pathogenese der Sigatokakrankheit der Banane ist in folgender Abbildung am Beispiel *Mycosphaerella musicola* dargestellt, deren Symptome den durch *Mf* verursachten entsprechen:

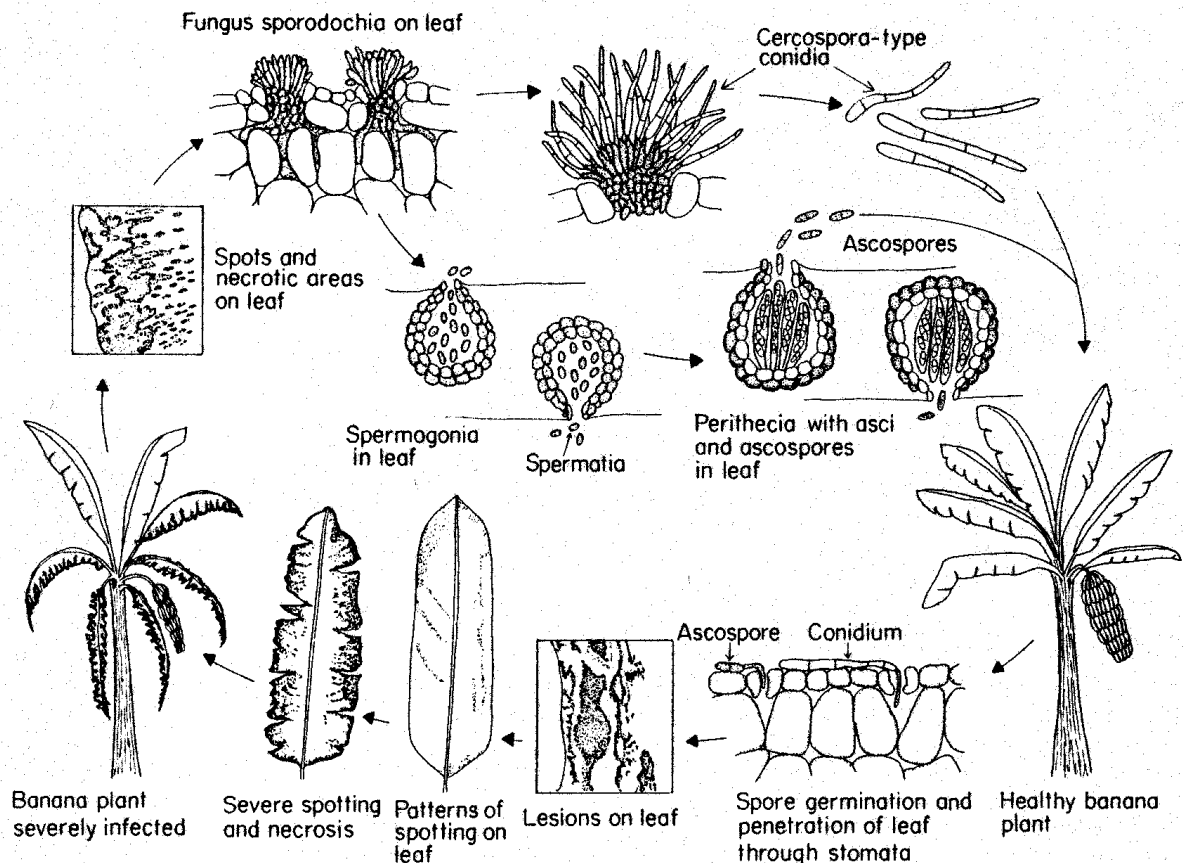


Abb. 3 Entwicklung der Gelben Sigatokenkrankheit im Pathosystem *Musa sp./Mycosphaerella musicola* (AGRIOS 1988)

Die Ernährungsweise des Erregers in der ersten Phase der kompatiblen Interaktion wird von BEVERAGGI et al (1993) als biotroph beschrieben. Unter Berücksichtigung der gesamten Pathogenese kann *Mf* als hemibiotroph oder fakultativ biotroph bezeichnet werden. Diese Form des Parasitismus zeichnet sich durch eine biotrophe Entwicklungsphase vor der anschließenden nekrotrophen Aneignung von Nährstoffen aus (BAILEY 1983, CLARKSON 1992).

Die Schädigung gegenüber *Musa sp* in der biotrophen Phase ist die Folge der Nutzung von Energie- und Mineralstoffreserven des pflanzlichen Apoplasten, wodurch der Nährstofftransfer aus den sources der Blätter in die sinks der Früchte stark vermindert wird. In der nekrotrophen Phase werden die im Cytosol vorhandenen Ressourcen nach Auflösung der pflanzlichen Zellwände und des Plasmalemmas direkt genutzt und dadurch die Photoassimilation in den befallenen Blättern vollständig verhindert (AGRIOS 1988). Auch ein leichter Befall mit *Mf* kann zu einer früheren Seneszens der betroffenen Blätter führen und auf diese Weise die Frühereife der Früchte bewirken (STOVER und SIMMONDS 1987, JEGER et al 1995).

Zur Bekämpfung der Krankheit wurden zunächst Kontaktfungizide eingesetzt, die ab den 70er Jahren zunehmend durch systemische Wirkstoffe ersetzt wurden: Die intensive Anwendung von Benzimidazolen, die die Hemmung der Mitose bewirken, führte schon bald zu Resistenzerscheinungen (FULLERTON 1990, SCHULZ und SCHEINPFLUG 1990) sowie in der Folge zur Einführung neuer Wirkstoffe aus Morpholinderivaten und Triazolen (Hemmung der

Ergosterolbiosynthese) und deren Kombination mit nichtsystemischen Produkten (STOVER 1990). Inzwischen sind auch Kreuzresistenzen zwischen verschiedenen Wirkstoffen aufgetreten (SHILLINGFORD 1990).

Soweit bekannt, ist die Pathogenese von *Mf* nicht von der Melaninbildung in Sporen oder Penetrationsorganen abhängig, so daß der Einsatz von Fungiziden zur Hemmung der Melaninbiosynthese, wie z. B. Tricyclazol[®], keinen Einfluß auf die Pathogenität und Virulenz erwarten läßt.

2.4.3 Symptomatologie und Wirtsreaktionen gegenüber *Mf*

Die Blattsymptome des kompatiblen Wirt-Pathogenkomplexes sind anhand umfangreicher Bonituren natürlicher Infektionen unter Feldbedingungen in klassischen *Musa*-Anbaugebieten beschrieben worden; zur Reproduktion der Ergebnisse an *in vitro*-vermehrten Jungpflanzen unter Klimakammer-Bedingungen ist folgende Einteilung entwickelt worden, die eine Klassifizierung sowohl der Erregerisolate in Pathotypen als auch der *Musa* cv in Resistenz- bzw. Anfälligkeitsreaktionen ermöglicht (FULLERTON und OLSEN 1995).

Tab. 2 Stadien der Symptomentwicklung und Graduierung der Reaktionen von *Musa* cv nach Inokulation mit *Mf* (FULLERTON und OLSEN 1995)

Symptomentwicklung			Reaktion		
Stadium	Symptome	Stadium/Zeit (dpi)	Grad	Pathogen	Wirt
1	1-2 mm hellbraune Flecken auf Unterseite	max. 2	1	avirulent	hochgradig resistent
2	5-10 mm Flecken auf Unterseite, teilweise Chlorosen auf Oberseite				
3	deutliche Flecken auf Ober- und Unterseite	max. 3	2	geringe Virulenz	leicht resistent
4	10 mm nekrot. Flecken mit ext. Clorose angr. Gewebes	4 > 45 dpi	3	geringe Virulenz	resistent
		4 < 45 dpi	4	hohe Virulenz	leicht anfällig
		4 < 30 dpi	5	sehr hohe Virulenz	hochgradig anfällig

Übereinstimmend klassifizieren mehrere Autorengruppen (FOURÉ et al 1990, SALLÉ et al 1990, BEVERAGGI et al 1993, LEPOIVRE et al 1993) die beschriebenen Symptome auf *Musa*-Blättern nach Inokulation mit dem Erreger *Mf* in drei hinreichend voneinander unterscheidbare Reaktionen:

- Hochgradige Resistenz (HR): Symptomentwicklung kleinflächig bis maximal Stadium 2, Hypersensitivitätsreaktion der Pflanze; keine Entwicklung des Erregers bis zur Sporulation; inkompatible bzw. heterologe Interaktion.
- Partielle Resistenz (PR): Symptomentwicklung bis Stadium 4 innerhalb von 45 dpi, unter Feldbedingungen verbleiben bis zur Ernte funktionsfähige Blätter; sexuelle und asexuelle Sporenbildung des Erregers; kompatible bzw. homologe Interaktion.
- Anfälligkeit (susceptibility, S): Symptomentwicklung durch flächendeckende Nekrose des gesamten Blattgewebes innerhalb von 30 dpi gekennzeichnet; sexuelle und asexuelle Sporulation des Pathogens; kompatible bzw. homologe Interaktion.

Die mit PR und S bezeichneten Reaktionen stellen nach Fouré (1990) verschiedene Klassen eines quantitativen Phänotyps dar, der als empfindlich gegenüber dem Pathogen zusammengefaßt werden kann.

Soweit die angebauten *Musa* cv auf ihre Reaktion gegenüber dem Erreger *Mf* untersucht worden sind, besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Sorten innerhalb einer Genomgruppe (Abschnitt 3.1.1, Tabelle 5) bezüglich der Symptomentwicklung (mit Ausnahme der hypersensitiven Reaktion), der im folgenden Abschnitt betrachtet werden soll.

2.4.4 Spezifität und genetische Basis des Wirt-Pathogenverhältnisses

Die Spezifität des Wirt-Pathogen-Verhältnisses wird auf verschiedenen taxonomischen Ebenen beider beteiligter Organismen bestimmt (siehe Abschnitt 2.1, Tabelle 1). Als Artenspezifität („species-species-specificity“) wird dabei die Ausbildung eines kompatiblen Pathosystems zwischen der Erregerart und den Wirten derselben Pflanzenart bezeichnet; die Sortenspezifität („race-cultivar-specificity“) bezieht sich auf die Fähigkeit eines Pathotyps oder *forma specialis* eines bestimmten Pathogens zur Besiedlung bestimmter Sorten einer Pflanzenart (HEATH 1981, BAILEY 1983, 1991). Im Falle des hier betrachteten Pathosystems Schwarze Sigatokakrankheit sind kompatible Wirt-Pathogen-Verhältnisse auf der Artenebene nur zwischen *Mf* und *Musa* sp aufgetreten (STOVER und SIMMONDS 1987). Die Sortenspezifität ist auf Seiten des Wirtes durch die drei beschriebenen Reaktionen gegenüber Isolaten des Erregers beschrieben; bezüglich des Pathogens sind bisher keine Pathotypen definiert worden, nach Untersuchungen von FULLERTON und OLSEN (1991) weisen einige Isolate allerdings eine unterschiedliche Pathogenität gegenüber verschiedenen *Musa* cv auf (Tabelle 3b). Die Ergebnisse der Untersuchungen an 57 Isolaten von *Mf* unter Einsatz von RFLP durch CARLIER et al (1994) zeigen einen hohen Grad

an Polymorphismus zwischen Isolaten aus verschiedenen Regionen (Entfernungsindex $D_{xy} > 0.15$), der jedoch nicht mit Daten zur Pathogenität und Virulenz gegenüber *Musa cv* in Beziehung gesetzt wurde.

Tab. 3 Spezifität von Wirt-Pathogen-Beziehungen bei *Mycosphaerella spp* und *Musa sp*

a Artenspezifität von *Mycosphaerella spp* gegenüber verschiedenen Wirtspflanzenarten (STOVER und SIMMONDS 1987, OKU et al 1987)

<i>Mycosphaerella</i>	<i>Musa sp</i>	<i>Chrysanthemum moliflorum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Ribes nigrum</i>
• <i>fijiensis</i>	S	R	R	R	R
• <i>ligulicula</i>	R	S	R	R	R
• <i>melonis</i>	R	R	S	R	R
• <i>musicola</i>	S	R	R	R	R
• <i>pinodes</i>	R	R	R	S	R
• <i>ribis</i>	R	R	R	R	S

b Sortenspezifität von *Mf*-Isolaten gegenüber verschiedenen *Musa*-Varietäten (TEZENAS DU MONTCEL 1990, FULLERTON und OLSEN 1991, OKOLE 1995)

<i>Mf</i> -Isolat:	T8 (AAAA)	Yangambi (AAA)	Paka (AA)	Calcutta (AA)	Cachaco (ABB)
• 294 (W. Samoa)	R	R	R	S	PR
• 318 (PNG)	R	R	R	n.b.	n.b.
• 689 (Rarotonga)	S	S	S	R	n.b.
• 743 (Tonga)	S	S	S	S	n.b.

n.b. = nicht bekannt

Die genetische Analyse der Resistenz von *Musa cv* gegenüber dem Erreger *Mf* ist nach FOURÉ (1993) lange Zeit nicht möglich gewesen, da die Forschung auf die für die Bananenproduktion wichtigen triploiden Sorten mit ihrem hohen Grad an Sterilität und Parthenokarpie (Abschnitt 2.2) konzentriert war. Eine Einbeziehung diploider fertiler Wildbananen aus der Genomgruppe AA in die Untersuchungen zur Reaktion gegenüber dem Pathogen ermöglichte jedoch deren genetische Charakterisierung und die nachfolgende Nutzung homozygotischer hochresistenter Sorten als Quelle fertiler Gameten (FOURÉ 1993, ORTIZ und VUYLSTEKE 1994, CRAENEN und ORTIZ 1996). Die Ergebnisse dieser Kreuzungsexperimente werden mit dem Vorhandensein von mindestens drei voneinander unabhängigen Genloci erklärt, von denen das rezessive Allel des Hauptlocus (*bsr₁*) und zwei additive Nebenloci (*bsr₁* und *bsr₂*) für die Resistenzreaktion verantwortlich gemacht werden. Diese Gene verursachen einen starken

Dosierungseffekt bei zunehmendem Ploidiegrad, der den im Feld zu beobachtenden höheren Grad an Resistenz in tetraploiden Pflanzen im Vergleich zu diploiden Bananen erklärt (ORTIZ 1995). Das Vorhandensein rezessiver Resistenzgene in anfälligen Pflanzen wird durch die Expression des dominanten Hauptgens für Empfindlichkeit (*BS1*) maskiert (CRAENEN und ORTIZ 1996). Damit kann nach ORTIZ und VUYLSTEKE (1994) die Inkompatibilität von *Musa* gegenüber *Mf* als ein Beispiel quantitativer Resistenz angesehen werden, die durch die Funktion multipler rezessiver Allele eine graduelle Abwehrreaktion hervorruft. Nach der Gen-für-Gen-Hypothese erfordert eine Überwindung dieses Resistenzmechanismus eine dominante Mutation an einem Hauptlocus für Virulenz auf Seiten des Erregers, die nach FLOR (1971) nur sehr selten vorkommt, allerdings ist bei dem Heterokaryonthen *Mf* eine höhere Mutationsrate durch vegetative Hybridisierung zu erwarten.

Im Falle der mit dem Phänomen der hypersensitiven Reaktion in Zusammenhang gesetzten Sorte Yangambi km 5 ist zu betonen, daß infolge deren Sterilität bisher keine genetische Analyse der HR vorliegt und damit wichtige Aussagen über die Ursache der Inkompatibilität nicht getroffen werden konnten (FULLERTON und OLSEN 1991). Umfangreiche Kreuzungsexperimente von FOURÉ und TOMEKPE (1996) unter Einschluß der HR-Sorte Calcutta (Genom AA) zeigten einen hohen Vererbungsgrad des hypersensitiven Phänotyps; die Ergebnisse dieser Untersuchung waren nach Aussage der Autoren ein weiterer Beleg für die Komplexität der genetischen Basis der Resistenz gegenüber der Schwarzen Sigatokakrankheit.

2.4.5 Mechanismen der inkompatiblen Wirt-Pathogeninteraktion

Abwehrreaktionen von Pflanzen gegenüber Krankheitserregern können als strukturelle, d.h. morphologische, histologische und cytologische Faktoren einerseits sowie als biochemische und physiologische Mechanismen andererseits zusammengefaßt werden. Je nach dem Zeitpunkt der Bildung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die zur inkompatiblen Interaktion führen, wird zwischen prä- und postinfektionellen Reaktionen unterschieden (AGRIOS 1988, OKU 1992, COLLINGE et al 1994). Ist für die Pathogenität oder Virulenz des Erregers die Wirkung von wirtsspezifischen oder -unspezifischen Toxinen von Bedeutung, sind ebenfalls Faktoren pflanzlicher Insensitivität gegen diese Substanzen zu berücksichtigen (DURBIN 1983). Die Abwehrmechanismen von *Musa* gegenüber Pathogenen der Gattung *Mycosphaerella* sind folgendermaßen gegliedert (JEGER et al 1995): Präformierte Substanzen, strukturelle Faktoren, postinfektionelle Substanzen und Insensitivität gegenüber pilzlichen Toxinen. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Arbeiten verschiedener Autoren zu Abwehrmechanismen von *Musa sp* gegenüber pilzlichen Krankheitserregern zusammengefaßt:

Tab. 4 Literaturübersicht zu Untersuchungen von Abwehrmechanismen von *Musa sp* gegenüber pilzlichen Krankheitserregern

	untersuchte Komponente	Autoren
Präformierte Substanzen	Aminosäuren, C/N-Verhältnis	RANGASWAMI und NATARAJAN (1966)
	Phenole, Kohlenhydrate	JAYAPAL und MAHADEVAN (1968)
Strukturelle Faktoren	Histologie, Polyphenole	SALLÉ et al (1990)
	Stomatadichte	VAZQUEZ et al (1990)
	Blattmorphologie	BEVERAGGI et al (1993)
Postinfektionelle	Glukanase, Chitinase	LEPOIVRE et al (1993)
Abwehrstoffe	Phytoalexine	LUIS et al (1993, 1994, 1995, 1996)
	Peroxidase, PAL	OKOLE (1995)
Pilzliche Toxine	Rohextrakte	MOLINA und KRAUSZ (1989), NATURAL (1990)
	Fijiensin	UPADHYAY et al (1990)
	2,4,8-THT	STIERLE et al (1991), OKOLE (1995)

2.4.5.1 Präformierte Substanzen

Erste Untersuchungen von RANGASWAMI und NATARAJAN (1966) bezogen sich auf die Analyse von Blattinhaltsstoffen in gesunden und infizierten *Musa*-Blättern einer anfälligen Sorte; dabei traten nach einer Infektion mit *Mycosphaerella musicola* verminderte Gehalte an einigen Aminosäuren und ein reduziertes C/N-Verhältnis auf, die als Ursache oder Wirkung des Befalls interpretiert werden können. Ein Vergleich resistenter und anfälliger Sorten durch JAYAPAL und MAHADEVAN (1968) zeigte einen höheren Gehalt an Phenolen, reduzierenden und nichtreduzierenden Zuckern und einen geringeren Gehalt an Amino-Stickstoff bei einer gegenüber *Mycosphaerella musae* resistenten Sorte von *Musa balbisiana*. MOURICHON et al (1990) untersuchten die Rohextrakte nicht infizierter *Musa*-Blätter jeweils einer hochgradig (HR) und teilweise resistenten (PR) sowie anfälligen (S) Sorte auf ihre Wirksamkeit gegenüber dem Wachstum von *Mf*; die Extrakte der beiden resistenten Sorten bewirkten eine verminderte Sporenkeimung und geringere Keimschlauchlängen; zwei fungitoxische Fraktionen konnten dünnschichtchromatographisch getrennt werden. Nach Beobachtungen von GAUHL et al (1995) beeinflusst der Gehalt an Stärke und Zucker im Blatt die Entwicklung der Schwarzen Sigatokakrankheit.

2.4.5.2 Strukturelle Faktoren

Bei Untersuchungen von *Musa*-Gewebe aller drei bekannten Reaktionstypen gegenüber *Mf* (HR, PR, S) durch SALLÉ et al (1990) wurden keine histologischen Unterschiede im Blattaufbau festgestellt. Allerdings zeigten die Menge und die Verteilung osmiophiler Substanzen in den Zellen der verschiedenen Sorten spezifische Charakteristika, die sich nach Infektion mit dem

Pathogen noch verstärkten: In der HR-Sorte sind osmiophile Strukturen nur als dünne Schicht auf der Innenseite des Tonoplasten zu beobachten, in der PR-Reaktion sind prä- und in zunehmendem Maße postinfektionell osmiophile Bereiche im Palisaden- und Schwamm-parenchym sichtbar, die bei der empfindlichen Sorte eine schnellere Ausdehnung zeigen. Diese Bereiche sind als Polyphenole angesprochen worden, die entweder zur Abwehrreaktion der Pflanze gehören oder als Folgeerscheinung nach Pilzbefall interpretiert werden können (SALLÉ et al 1990). In Untersuchungen zum Infektionsprozeß konnten keine anatomischen Unterschiede zwischen verschiedenen *Musa*-Sorten festgestellt werden, allerdings wurde eine größere Anzahl an Stomata auf der Blattoberseite der empfindlichen Sorte beobachtet (VAZQUEZ et al 1990). Die Beziehung zwischen höherer Stomatadichte und Resistenz gegenüber dem Erreger wird allerdings durch den Einfluß verschiedener Genome der untersuchten *Musa* cv beeinflusst, die die Herleitung eines direkten ursächlichen Zusammenhangs zur Infektion nicht erlauben (JEGER et al 1995). Die Wachsenreicherung auf der Oberseite der Kutikula im Verlauf der physiologischen Alterung der Blätter ist in allen untersuchten Sorten gleich, die Infektion erfolgt unter natürlichen Bedingungen am sich entfaltenden jüngsten Blatt (BEVERAGGI ET AL 1993).

2.4.5.3 Postinfektionelle Abwehrstoffe

Als postinfektionelle Abwehrstoffe werden die Produkte von chemischen Reaktionen der Pflanze als Antwort auf einen Befall mit mikrobiellen Erregern bezeichnet (AGRIOS 1988, OUCHI 1991, OKU 1992, ELSTNER et al 1996). Dazu gehören:

- Die Aktivierung von Enzymsystemen zum Abbau pilzlicher Zellwandbestandteile (Chitinase, β -1,3-Glukanase) und weiterer **PR-Proteine**;
- die **Synthese von Gerüstsubstanzen** und deren Einlagerung in die pflanzliche Matrix: Lignin, Suberin, andere phenolische Verbindungen;
- die **Aktivierung von Enzymsystemen** zum Aufbau pflanzeigener Abwehrstoffe: L-Phenylalanin und dessen Metaboliten abbauende Enzyme des Phenylpropan-Biosyntheseweges, Peroxidase mit vielfachen Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel (LEGRAND 1983, EDWARDS und KESSMANN 1992);
- die Synthese und Akkumulation von antimikrobiellen Wirkstoffen: **Phytoalexine** (DIXON 1986).

Die **Hypersensitivitätsreaktion** inkompatibler Wirt-Pathogenbeziehungen wird in diesem Zusammenhang als ein komplexer Mechanismus zur Abwehr biotropher Erreger angesehen, der mit weiteren Abwehrmaßnahmen der Pflanze in Beziehung steht.

Im Falle der Wirtspflanze *Musa* sp liegen Untersuchungen zu folgenden Komponenten der Abwehr pilzlicher Erreger vor: Eine Untersuchung von hydrolytischen Enzymen bei verschiedenen *Musa* cv durch LEPOIVRE et al (1993) zeigte eine erhöhte Aktivität der Gesamtglukanase und Chitinase bei der HR-Sorte Yangambi km 5 wenige Tage nach Inokulation mit *Mf*. Nach Ergebnissen von OKOLE (1995) wurde die Aktivität der Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL) und

Peroxidase von inokulierten *Musa cv* (HR- und S-Sorte) innerhalb von 24 Stunden nach Inokulation mit dem Erreger gesteigert; ebenso stieg der Gehalt an *ortho*-Dihydrophenol deutlich an; ein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Sorten der Wirtspflanze bestand aber nicht. Eine Arbeitsgruppe von Luis et al (1993, 1994, 1995) beschrieb die Isolierung und Identifizierung mehrerer Phytoalexine aus *Musa acuminata* (Genom AAA, empfindliche Sorten Grand Dwarf und Valery) nach Induktion mit dem Antibiotikum Kanamycin: Dabei wurden aus dem Blattgewebe und aus der Frucht die beiden Phenalenone Irenolon und Emenolon ($C_{19}H_{12}O_3$, MW = 288 Da) als Produkte des Phenylalanin/Tyrosin-Metabolismus charakterisiert; vier weitere als Phytoalexine bezeichnete Substanzen (Musanolon C bis F, MW = 306 bis 336 Da) wurden ebenfalls isoliert (Luis et al 1996). Über die Wirkungen dieser Substanzen gegenüber pilzlichen Erregern sowie deren Vorkommen und Funktion in *Mf*-resistenten Sorten liegen keine Angaben vor.

2.4.5.4 Insensitivität gegenüber pilzlichen Toxinen

In bezug auf die Sensitivität pflanzlicher Gewebe gegenüber mikrobiellen Substanzen sind folgende Mechanismen bekannt, durch die die toxische Wirkung auf Wirtszellen vermindert werden kann (DURBIN 1983):

- rasche Metabolisierung der toxischen Substanz;
- Nichtvorhandensein von Zielstrukturen (Rezeptoren);
- Fähigkeit zur Regeneration geschädigter Zellstrukturen bei resistenten Pflanzen.

Im Falle der Interaktion zwischen *Musa cv* und den als Toxinen postulierten Sekundärmetaboliten von *Mf* liegen keine Untersuchungen über mögliche Ursachen der Insensitivität vor.

In verschiedenen Arbeiten ist aber die Wirkung von *Mf*-Extrakten und dessen Fraktionen bzw. Bestandteilen auf unterschiedliche *Musa cv* beschrieben worden: MOLINA und KRAUSZ (1989) verwendeten Rohextrakte des Erregers zur Behandlung verschiedener *Musa cv* und berichteten von einer nekrotischen Reaktion der Sorten auf die Behandlung mit verdünnten Rohextrakten, die der Empfindlichkeit gegenüber *Mf* analog war. NATURAL (1990) konnte bei Anwendung einer vergleichbaren Methode demgegenüber keine unterschiedlichen Reaktionen zwischen resistenten und empfindlichen Sorten feststellen. Erstmals isolierten UPADHYAY et al (1990) aus *Mf*-Rohextrakten das heterocyclische Fijiensin, das keine Wirtsspezifität gegenüber verschiedenen *Musa cv* aufwies. STIERLE et al (1991) isolierten mehrere Fraktionen aus *Mf*-Rohextrakten und beobachteten eine Insensitivität der resistenten *Musa cv* IV-9 (Genom AA) gegenüber dem pilzlichen Metaboliten 2,4,8-THT bei Dosen bis zu $10 \mu\text{g } 5 \mu\text{l}^{-1}$. Dieses Ergebnis führte zu der Postulierung des 2,4,8-THT als wirtsspezifisches Toxin (HST), das nach NOVAK et al (1993) ein hohes Potential für die Nutzung wirtsspezifischer Toxine zur Induktion oder zum screening resistenter *Musa cv* bietet. Nach LEPOIVRE et al (1993) entspricht die Reaktion der HR-Sorte Yangambi km 5 (Genom AAA) auf verschiedene Dosen des Kultur-

filtrates von *Mf* allerdings derjenigen der empfindlichen Sorte Horn (AAB), wohingegen die PR-Sorte Fougamou (ABB) eine verminderte Sensitivität gegenüber den Toxinen aufweist. Die Untersuchungen von OKOLE (1995) wurden mit verschiedenen Fraktionen der durch Dünnschichtchromatographie getrennten Rohextrakte von *Mf* durchgeführt: Dabei traten bei allen isolierten Substanzen, darunter auch 2,4,8-THT und Juglon, deutliche Unterschiede im Durchmesser der nekrotischen Flecke auf den Blättern der verschiedenen *Musa* cv auf, die der spezifischen Reaktion gegenüber dem Pathogen entsprachen; bei Anwendung von 2,4,8-THT auf Kalli bzw. Dünnschnittpräparate aus dem Stengelbereich („micro-cross section“) reagierte die empfindliche Sorte Horn (AAB) mit leicht höherer Sensitivität als die HR-Sorte Yangambi km 5 (AAA). In einem weiteren Versuch wurden resistente Pflanzen aus einer Population anfälliger *Musa* cv durch ein doppeltes Screeningsystem aus pilzlichem Rohextrakt und 2,4,8-THT selektiert und auf ihre Reaktion gegenüber *Mf* geprüft: Zwischen 58 und 96 % der regenerierten Pflanzen waren resistent gegen verschiedene Isolate des Erregers unter *in vivo*-Bedingungen (OKOLE und SCHULZ 1997).

Insgesamt liegen zu der Frage der Spezifität und der möglichen Wirkungen verschiedener Substanzen und deren Gemischen aus Rohextrakten des Erregers *Mf* unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Ergebnisse vor. Insbesondere die Interpretation der beobachteten praktischen Erfolge erfordert eine weitergehende Untersuchung dieser pauschal als Toxine bezeichneten Metaboliten.

3 Material und Methoden

Bei den im folgenden Kapitel beschriebenen Methoden der Versuche mit der Wirtspflanze *Musa cv* (Kapitel 3.1), dem Erreger *Mf* (3.2) und dem Pathosystem aus beiden Organismen bzw. deren Produkten (3.3) wird auf die im Anhang tabellarisch erfaßten Chemikalien und Geräte verwiesen. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Anwendung gemäß Herstellerangaben und bestmöglicher Laborpraxis.

Die experimentellen Daten wurden in der kleinstmöglichen Versuchseinheit getrennt erhoben, wobei im Falle von biochemischen und physiologischen Kennwerten eine methodenbedingte Zusammenfassung der gleichbehandelten Wiederholungen zur Aufbereitung der Proben erfolgte. Die Messungen wurden in diesem Falle mindestens dreimal wiederholt, und die statistischen Parameter repräsentieren die Gesamtheit der gepoolten Stichproben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS for Windows; die gewonnenen Meßwerte wurden im Bedarfsfalle transformiert, auf das Vorliegen von gegenseitiger Unabhängigkeit, Normalverteilung sowie Varianzhomogenität geprüft und sowohl deskriptiv als auch varianzanalytisch weiterverarbeitet (SACHS 1992). Bei Angaben zu signifikanten Unterschieden in multiplen bzw. Rangverfahren wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.05$ unterstellt.

3.1 Untersuchungen der Wirtspflanze *Musa sp*

3.1.1 In vitro-Kultur von *Musa sp*

Das Ausgangsmaterial der *in vitro*-Kultur von *Musa sp* verschiedener Sorten entstammte den Sammlungen des International Network for the Improvement of Bananas and Plantains (INIBAP) am International Transit Center (ITC) der Katholieke Universiteit Leuven, Belgien, sowie des Department of Plant Science der Obafemi Awolowo University (OAU) in Ile-Ife, Nigeria (OKOLE 1995). Die seit 1991 unter *in vitro*-Bedingungen kultivierten *Musa cv* sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Die Erhaltung und Multiplikation der Gewebekulturen und die Regeneration von Ganzpflanzen erfolgten nach den von VUYLSTEKE (1989) und ISRAELI et al (1995) zusammengefaßten Methoden. Die Zusammensetzung der flüssigen und gelierten Nährmedien ist im Anhang, Tabelle 13, aufgeführt, der pH-Wert wurde mit Kalilauge auf 5.7 eingestellt. Vitamine, Wachstumsstoffe und Antioxidantien wurden dem autoklavierten Medium nach Abkühlung durch einen Sterilfilter (0.22 μm) zugesetzt. Bei einer Temperatur von 26°C, einer Lichtintensität von 150 bis 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden wurden die Kulturen zur Multiplikation alle drei Wochen auf neue gelierte MS-Nährmedien in Petrischalen umgesetzt. Um die Gefahr somaklonaler Variationen zu vermindern, wurden die jeweils deutlich differenzierten Schößlinge („buds“) selektiert, vereinzelt und unmittelbar auf neues Nährmedium gesetzt. Nach Umsetzung auf Regenerationsmedium mit vermindertem Cytokinin-

und erhöhtem Auxingehalt in Kulturgefäße von 350 ml erfolgte eine sechswöchige Inkubation unter gleichen Bedingungen bis zum Transfer auf Hardeningmedium ohne Zusatz von Wuchsstoffen und mit halbiertem Zucker- und Mineralstoffgehalt in Kulturgefäßen von 1000 ml. Nach Erreichen einer Wuchshöhe von etwa 15 cm wurden die *ex vitro*-Pflanzen auf sterilisiertes Bodensubstrat (Einheitserde:Torf:humoser Sand:Bentonit 1:1:1:0.05) umgesetzt und in der Klimakammer die Luftfeuchte durch übergestülpte Polyethylen tüten für weitere zwei bis drei Wochen auf annähernd 100 % gehalten. Der Hell-Dunkel-Rhythmus wurde auf 14/10 Stunden eingestellt, die Temperatur betrug 24°C, und die Lichtintensität auf der oberen Blattfläche erreichte etwa 250 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Die mineralische Düngung erfolgte mit Hakaphos Blau (3.5 g l⁻¹) als periodische Gabe in flüssiger Form (ISRAELI et al 1995).

Tab. 5 Sortenbezeichnungen, Genom, Reaktion gegenüber *Mf*, Herkunft und Genbank-Sammlung der im FG Phytomedizin der HU Berlin kultivierten *Musa cv* (STOVER und SIMMONDS 1987, OKOLE 1995, INIBAP 1997)

Sorte (ITC-Nr.)	Genom	Reaktion gegenüber <i>Mf</i>	Herkunft	Genbank
Yangambi km 5 (1123)	AAA	HR	Guadeloupe	INIBAP
Williams (0400)	AAA	S	Australien (?)	OAU
Petite Naine	AAA	S	Karibik (?)	INIBAP
Dominico Hartón (0644)	AAB	S	Kolumbien	INIBAP
N4	AAB	nicht bekannt	nicht dokumentiert	nicht dokumentiert
Bobby Tannap	AAB	S	Kamerun	OAU
U12	AAB	nicht bekannt	nicht dokumentiert	nicht dokumentiert
18 Rouge French	AAB	S	nicht dokumentiert	INIBAP
Njock Kon	AAB	S	nicht dokumentiert	INIBAP
Cachaco (0643)	ABB	PR	Kolumbien	INIBAP
Moenang	ABB	PR	nicht dokumentiert	INIBAP
Fougamou	ABB	PR	nicht dokumentiert	OAU
Nakitengwa (1180)	ABB	PR	nicht dokumentiert	INIBAP
Tjaulagada	AB	S	Java	OAU

Zur Etablierung von Kalluskulturen wurden die basalen Bereiche der Meristeme mit beginnender Kallusbildung auf Multiplikationsmedium abgetrennt und auf SH-Medium mit hohem

Auxingehalt übertragen. Der Transfer der entwickelten Kalli in Flüssigmedien erfolgte nach Erreichen einer Größe von etwa 1.0 cm Durchmesser. Alle Kallusgewebe wurden im Dunkeln bei 26°C gehalten, die Flüssigkulturen wurden mit etwa 90 rpm bewegt.

Zellsuspensionen wurden nach DHEDÁ et al (1991) direkt aus meristematischem Gewebe bzw. nach NOVAK et al (1989) aus Kalli in Flüssigmedien gewonnen. Die Nährstoffzusammensetzung entspricht der im Anhang, Tabelle 13 für Kalluskulturen nach Schenk und Hildebrandt angegebenen.

Sowohl Kalluskulturen als auch Zellsuspensionen wurden lichtmikroskopisch auf ihre Vitalität und Embryogenität untersucht. Die Anfärbung erfolgte mit Evans Blue, welches die lebende Zellwand nicht durchdringt und somit nur vitale Zellen transparent erscheinen läßt.

Gelegentlich auftretende Kontaminationen wurden mit Natriumhypochlorid (2.0 %, 30 Sekunden) zur Oberflächensterilisierung und nachfolgendem Transfer auf gelierte Nährböden mit folgenden Antibiotika kontrolliert: Penicillin G (110.0 µM), Streptomycinsulfat (34.3 µM), Chlortetracyclin-Hydrochlorid (19.4 µM).

3.1.2 Bestimmung der Enzymaktivität von PAL

Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL) wird als zentrales Enzym zur Metabolisierung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen beschrieben, die zur Abwehr mikrobieller Erreger bedeutsam sind (MANSFIELD 1983, DIXON 1986): Das aus der Enzymreaktion hervorgehende Produkt Zimtsäure (CA) bildet die Ausgangssubstanz für die Synthese von Cumarinen durch den Shikimat-Biosyntheseweg und den Aufbau phenolischer Verbindungen (Flavone, Isoflavonderivate) durch den Phenylpropan-Biosyntheseweg. Zur Bestimmung der Aktivität von PAL wurde das aus dem Substrat L-Phenylalanin umgesetzte Produkt CA photometrisch gemessen. Diese Vorgehensweise basiert auf der Methode von Lamb (zit. nach EDWARDS und KESSMANN 1992) und wurde folgendermaßen modifiziert: Die Entnahme von etwa 500 mg FW pro Probe erfolgte mit dem Korkbohrer, als Pufferlösung wurde 50 mM Tris-HCl + 14 mM 2-Mercaptoethanol (1500 µl g⁻¹FW) bei 4°C zugegeben. Die Probe wurde unmittelbar nach der Gewinnung in eisgekühlten Mörsertiegeln mit säuregereinigtem Quarzsand homogenisiert und zur Reinigung bei 8150 g, 12 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde geteilt zur Bestimmung des Protein- (s. u.) sowie des CA-Gehaltes; zur Fällung von unerwünschten Pflanzenfarbstoffen wurde dreimal mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP 10 mg, 15 h in 0.1% BSA bei 4°C vorgequollen) je 2 min auf Eis inkubiert und je 5 min bei 2100 g zentrifugiert (LEIDREITER 1995). Der Überstand wurde im Verhältnis 1:9 (Substratsättigung) mit 12.1 mM L-Phenylalanin versetzt und bei 272 nm in UV-Küvetten während der Inkubation bei 40°C photometrisch in Intervallen von 5 min gemessen. Zur Kontrolle diente eine parallele Inkubation von Pflanzenprobe mit D-Phenylalanin. Die Erhöhung der Absorption von CA in einem Zeitraum

zwischen 45 und 75 min Inkubationsdauer diente der Berechnung der jeweiligen PAL-Aktivität in Katal (pkat mg^{-1} Protein).

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte nach BRADFORD (1976) unter Verwendung von BSA als Eichstandard. Die Endkonzentration der Farblösung betrug 0.01% (v/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 in 4.7% (v/v) EtOH und 8.5 % (v/v) Phosphorsäure. Die gepufferte Probe wurde in einem Verhältnis zugesetzt, das einem Proteingehalt $<100 \mu\text{g}$ entspricht; die Extinktion des entstehenden Farbkomplexes war proportional zur Konzentration der Gesamtproteine und wurde bei 629 nm (Raumtemperatur) gemessen.

Der Quotient aus PAL-Aktivität und Proteingehalt beschreibt den Umsatz von Substrat und ergibt die Enzymaktivität in $\text{pkat mg}^{-1}\text{Protein}$.

3.1.3 Gewinnung von Sekundärmetaboliten aus *Musa*-Blattgewebe

Zur biochemischen Charakterisierung des Kontaktraumes von Erreger und Wirt wurde der Apoplast von *Musa*-Blattgewebe verschiedener Sorten extrahiert, chromatographisch getrennt und im Biotest auf die Wirkung gegenüber pilzlichen Organismen geprüft.

Als biogener Stressor zur Anregung pflanzlicher Abwehrmechanismen wurde nach Luis et al (1993) das Antibiotikum Kanamycin eingesetzt ($10 \text{ mg ml}^{-1} + 0.05\% \text{ [v/v] Tween 80}$), das auf die ribosomale Proteinbiosynthese wirkt.

Die Gewinnung der interzellulären Flüssigkeit erfolgte mit verschiedenen Methoden, die sowohl eine direkte Zentrifugation als auch eine Vakuuminfiltration von Blattgewebe und anschließende chemische Extraktion mit apolaren Lösungsmitteln umfaßte. Nach DE WIT und SPIKMAN (1982) wurden Blattstücke parallel zur Aderung in speziellen Röhrchen mit Siebvorsatz platziert und 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Um den bei der nachfolgenden Analyse störenden Ausfluß der Milchröhren zu binden, wurden Zentrifugenröhrchen mit einem Molekularfilter von 100'000 Da eingesetzt. In Weiterentwicklung der „drop-diffusate method“ wurde von KEEN (1978) die „facilitated diffusion method“ beschrieben, die aus der Vakuuminfiltration von Blattstücken in alkoholischer Lösung (40% [v/v] EtOH, $15 \text{ ml g}^{-1} \text{ FW}$) bei 250 mbar und der nachfolgenden Behandlung von 4 h auf dem Rotationsschüttler besteht; die gewonnene alkoholische Lösung wurde vakuumverdampft und mit EtOAc dreimal extrahiert. Die Trennung der Rohextrakte erfolgte mit TLC der Systeme B und C (siehe Anhang, Tabelle 18).

Alternativ erfolgte die Nutzung der nach Vakuumverdampfung gewonnenen wässerigen Lösung als Substrat zur Inkubation von *Mf*, um deren Einfluß auf den pilzlichen Sekundärstoffwechsel zu untersuchen: Dazu wurde die Lösung auf $3 \text{ ml g}^{-1} \text{ FW}$ eingestellt und die Nährstoffe gemäß M-1D-Flüssigmedium (siehe Anhang, Tabelle 14) zugefügt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben.

Die Entwicklung der TLC-Platten wurde mit 5.0 %iger Schwefelsäure (v/v) in 95 % (v/v) EtOH vorgenommen. Zur Identifizierung biologisch aktiver Substanzen wurden die entwickelten TLC-Platten nach dem Verdampfen von Lösungsmittelrückständen mit sterilem SNA-Flüssigmedium bis zur Sättigung besprüht und eine Sporensuspension von *Cladosporium sp* (10^8 Sporen ml⁻¹) aufgetragen; die Inkubation erfolgte vier Tage unter Dauerlicht bei 26°C in der feuchten Kammer (SMITH 1982). Fehlende oder nur gering ausgebildete Keimschläuche indizierten Hemmwirkungen durch pflanzliche Metaboliten; die entsprechenden Zonen wurden aus den parallel entwickelten, nicht inokulierten oder inkubierten TLC-Platten herausgelöst und HPL-chromatographisch unter den Bedingungen der Systeme A und B (siehe Anhang, Tabelle 19) charakterisiert.

3.2 Untersuchungen des Pathogens *Mf*

3.2.1 *In vitro*-Kultur von *Mf*

Das Ausgangsmaterial zur *in vitro*-Kultur von *Mf* wurde in verschiedenen Anbauregionen von natürlich infizierten *Musa*-Pflanzen unter Feldbedingungen gewonnen (OKOLE 1995). Folgende Isolate wurden kontinuierlich seit 1991 unter kontrollierten Bedingungen kultiviert:

Tab. 6 Bezeichnungen und Herkünfte der Isolate von *Mf*

Bezeichnung	Herkunftsregion	isoliert aus (<i>Musa cv</i>):
• 294	West Samoa	nicht dokumentiert
• 309	Papua Neuguinea	Cavendish (AAA)
• 743	Tonga	T8 (AAAA)
• 750	Tonga	T8 (AAAA)
• CAM	Kamerun	Bobby Tanap (AAB)
• HON	Honduras	nicht dokumentiert
• NIG	Nigeria	Agbapa (AAB)
• OSHO	nicht dokumentiert	nicht dokumentiert

Zur *in vitro*-Kultur von *Mf* wurden Nährmedien verschiedener Zusammensetzung und Konsistenz verwandt (siehe Anhang, Tabelle 14). Die Erhaltung der Kulturen erfolgte auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) mit einer Umsetzung auf frische Nährböden im Abstand von 21 Tagen. Zur Produktion und Gewinnung pilzlicher Metaboliten wurden Flüssigmedien auf der Basis des von Filner für die Kultur von *Nicotiana tabacum* entwickelten Mediums M-1D, modifiziert durch eine Zugabe von Kokoswasser nach PINKERTON und STROBEL (1976), verwendet. Der pH-Wert wurde bei allen Medien mit Natronlauge auf 5.7 eingestellt.

Der Wirkstoff Trizyclazol[®] wurde zur Beeinflussung des pilzlichen Pentaketidmetabolismus (siehe Literaturübersicht, Abschnitt 2.3) eingesetzt, um durch die spezifische Hemmung von Reduktasen eine verstärkte Synthese des 2,4,8-THT zu erwirken. Die Zugabe des in 2.0 % EtOH gelösten Wirkstoffes erfolgte durch Sterilfilter nach Abkühlung des Nährmediums.

Bei der Inkubation von Flüssigmedien wurden ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und eine Lichtintensität von $180 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ etabliert. Die Flüssigmedien wurden mit 10 Myzelstücken von etwa 40 mm^2 Grundfläche pro Liter Nährlösung inokuliert. Zur Variation der Sauerstoffversorgung wurden verschiedene Kulturgefäße (Rund- und Erlenmeyerkolben mit luftdichtem Deckel und einem Verhältnis von Nährlösung zu Luftvolumen von 1:1; flache Kulturgefäße mit luftdurchlässigem Verschuß und einem Volumenverhältnis von 1:2) eingesetzt. Je nach Verhältnis von Grundfläche des Kulturgefäßes zum Volumen wurde eine Schüttelfrequenz von 40 bis 100 rpm auf dem Rotationsschüttler gewählt. Die Nährmedien aus infiltrierten Bananenblättern (siehe Abschnitt 3.1.3) wurden im Verhältnis 1:3 (FW/v) verdünnt und autoklaviert.

Die Inkubation der Pilzisolat auf gelierten Medien erfolgte bei 26°C unter Leuchtstoffröhren mit $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit periodischer Umsetzung alle 21 Tage. Zur Gewinnung von sporulierenden *in vitro*-Kulturen wurden infizierte, nicht nekrotisierte *Musa*-Blattstücke ausgeschnitten, in Ethanol (50 %) oberflächensterilisiert, mehrmals in sterilem Wasser gewaschen und auf SNA-Nährböden mit Antibiotikazusatz bei 25°C inkubiert (KREISEL und SCHAUER 1987). Die aus dem auswachsenden Myzel zu gewinnenden Konidien wurden zur weiteren Kultivierung auf PDA übertragen und dienten als Inokulumquelle im Versuch zur Konidienproduktion auf verschiedenen Nährmedien. Die Beimpfung erfolgte mit einer Suspension von 10^6 Konidien ml^{-1} . Die Konidien wurden durch Überstauen der Petrischale mit sterilem Aq. dest. + 0.05% (v/v) Tween 80 und mehrmaligem Schaben mit sterilem Objektträger über das Myzel gewonnen. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer bei Konidiendichten von $< 2.5 \cdot 10^6$ Sporen ml^{-1} .

Die Bestimmung der Myzeltrockenmasse wurde nach Filtern über Faltenfilter (Schleicher und Schüll 595½) und anschließender Trocknung (24 Stunden) bei 104°C durchgeführt (KREISEL und SCHAUER 1987). Die Messung des pH-Wertes in den periodisch entnommenen Proben von 1.0 ml erfolgte mit einer Mettler Toledo-Elektrode in Eppendorf-Reaktionsgefäßen.

3.2.2 Untersuchung der Sekundärmetaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges

3.2.2.1 Extraktion und Probenaufbereitung

Zur Extraktion von Sekundärmetaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges kamen die von STIPANOVIC und BELL (1977) sowie STIERLE et al (1991, 1992) beschriebenen Methoden zur Anwendung. Bei Beendigung der Inkubationsperiode nach dem jeweils angegebenen Zeitraum wurde das Myzel mit dem Ultra-Turrax T25 bei $25'000 \text{ rpm}$, 1 min homogenisiert. Zur Extraktion

der pilzlichen Metaboliten aus dem Myzel erfolgte die Zugabe von Methanol im Verhältnis 1:1 und eine Behandlung (24 h) bei 4°C auf dem Rotationsschüttler. Nach Filtration durch Faltenfilter 595½ und Vakuumverdampfung auf ca. ¼ des Ausgangsvolumens wurde Kochsalz bis zur Sättigung (ca. 30 g 100 ml⁻¹) zugegeben. Die Extraktion der apolaren Substanzen erfolgte durch zweimaliges Schütteln der wäßrigen Phase mit EtOAc im Scheidetrichter; nach Trennung der Phasen wurde das apolare Lösungsmittel abgenommen, über Membranfilter aus Polyamid (0.22 µm) vakuumfiltriert und mit Na₂SO₄ dehydrogeniert und gereinigt. Das Volumen wurde durch Vakuumverdampfung auf 5 ml l⁻¹ Ausgangsvolumen eingengt.

Die Probenaufbereitung erfolgte mit Festphasenröhrchen (SPE) unter Verwendung folgender stationärer und mobiler Phasen: Die Normalphasenmaterialien Cyanopropyl- (CN-U) und Aminopropylsilan (NH₂) sowie Silica (SiOH) wurden apolar mit Ethylacetat konditioniert, mit Hexan gewaschen und mit Ethylacetat und Methanol eluiert, die Umkehrphasen Octadecyl- (C-18) und Cyanopropylsilan polar mit Methanol und folgend Wasser konditioniert, mit Wasser gewaschen und mit Methanol eluiert (jeweils 5.0 ml pro Extraktionsschritt).

Zur Entwicklung einer für die vorliegende Untersuchung geeigneten Probenaufbereitung wurden die Standardsubstanzen 1,5-DHN und Juglon eingesetzt, deren Retentionszeiten unter HPL-chromatographischen Bedingungen (siehe Abschnitt 4.2.2.1, Tabelle 10) einem weiten Bereich pilzlicher Metaboliten aus den Rohextrakten von *Mf* entsprechen; die eingesetzte Substanzmenge betrug jeweils 10 µg 20 µl⁻¹ Probenvolumen (Lösungsmittel: EtOAc bei apolarer, MeOH bei polarer Konditionierung).

3.2.2.2 Dünnschicht- und HPL-Chromatographie

Der weiteren Auftrennung der Rohextrakte bzw. der mit SPE behandelten Substanzgemische diente der Einsatz chromatographischer Verfahren, die eine Quantifizierung der pilzlichen Metaboliten und deren Weiterverwendung im Biotest ermöglichte.

Die Dünnschichtchromatographie (TLC) wurde dabei grundsätzlich in der Normalphase unter Anwendung von Silica 60 mit Fluoreszenzfaktor 254 nm und verschiedenen mobilen Phasen durchgeführt (siehe Anhang, Tabelle 18): Zur Auftrennung der Rohextrakte von *Mf* wurde das System A mit Chloroform:Methanol 10:1 (STIERLE et al 1991) eingesetzt. Die im UV-Licht identifizierbaren Substanzflecke wurden von der Oberfläche entfernt und zur weiteren Charakterisierung durch HPLC und Massenspektrometrie (MS) in EtOAc (zweimalige Extraktion) aufgenommen.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgte an der Umkehrphase (RP) mit Octadecylsilan (ODS) als stationärer und einem Gradientensystem aus MeCN und Wasser mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM) als mobiler Phase (GREENBLATT und WHEELER 1986); die pilzlichen Metaboliten wurden mit einem linearen Gradienten von 13.4 bis 43.5 % MeCN in 18 min unter den gewählten chromatographischen Bedingungen (System A, siehe Anhang, Tabelle 19) getrennt und bei 254 nm detektiert. Die entsprechenden Fraktionen bei den jeweiligen

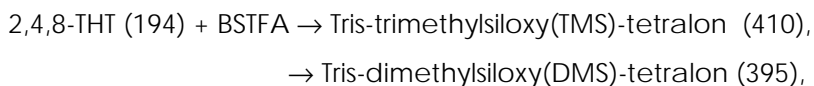
Retentionszeiten wurden manuell gesammelt, durch Vakuumverdampfung von polaren Lösungsmittelkomponenten befreit und mit EtOAc reextrahiert. Die Kalibrierung der quantifizierten Substanzen erfolgte mit kommerziellem Juglon bzw. im Falle des 2,4,8-THT durch wiederholtes Sammeln der Fraktion bei $t_R = 9.45$ min, Reextraktion, gravimetrische Bestimmung des nicht verdampfenden Rückstandes und Reinjektion in die HPLC. Die Absorptionsspektren der verschiedenen Substanzen wurden mit dem UV-Detektor unter den jeweiligen chromatographischen Bedingungen (Lösungsmittelzusammensetzung bei der jeweiligen Retentionszeit) aufgenommen. Die Berechnung der quantitativen Parameter erfolgte mit dem Barspec Data System (BDS) bzw. nach UNGER (1989).

Zur Gewinnung nicht verfügbarer Pentaketid-Metaboliten wurde die Thiele-Winter Acetoxylation zur Synthese von Naphtochinonen angewandt (MERCK1996). Dabei wurde Juglon in Essigsäureanhydrid gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure katalytisch zu 1,2,4,5- und 1,3,4,5-Tetraacetoxynaphtalen hydroxyliert; durch anschließende Oxidation im basischen Milieu entstanden jeweils 2- und 3-Hydroxyjuglon (SINGH et al 1969). Die Trennung beider Substanzen erfolgte im TLC-System D (siehe Anhang, Tabelle 19). Die Bestimmung der Retentionszeiten im HPLC-System A ermöglichte die Zuordnung von Substanzpeaks aus *Mf*-Proben.

3.2.2.3 Massenspektrometrie und Gaschromatographie

Die Bestimmung der Molekulargewichte verschiedener Fraktionen der Rohextrakte von *Mf* erfolgte massenspektrometrisch durch das Fachinstitut der HU Berlin für Angewandte Analytik und Umweltchemie. Die mit Hilfe der TLC getrennten und konzentrierten Fraktionen wurden lösungsmittelfrei und underivatisiert im Massenspektrometer HP 5995A bei einer Anfangstemperatur von 20°C und einem linearen Temperaturanstieg von 64°C min⁻¹ gemessen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenimpakt mit 70 eV.

Zur weiteren Analyse wurde die TLC-Fraktion mit dem Retentionsfaktor (R_f) = 0.34, die durch Nachweis mit MS die Substanz 2,4,8-THT enthielt, gaschromatographisch aufgetrennt und durch Kopplung mit MS die Molekulargewichte bestimmt. Die Derivatisierung erfolgte mit N,O-Bis-Silyl-trifluoracetamid (BSTFA) und führte zu folgenden Reaktionen (Molekulargewichte [Da] in Klammern):



sowie weitere silylierte Tetralonverbindungen (MW = 320, 305, 294) und die Fragmente funktioneller Gruppen von BSTFA (MW = 147, 75, 74, 73).

3.3 Untersuchungen der Wirt-Pathogeninteraktionen

3.3.1 Inokulation von Blattgewebe mit Pilzmyzel

Als Ausgangsmaterial zur Inokulation der Wirtspflanze mit dem Erreger dienten die aus der Gewebekultur in Boden überführten *Musa*-Ganzpflanzen (siehe Abschnitt 3.1) sowie das auf geliertem PDA wachsende Myzel von *Mf* (Abschnitt 3.2).

Da die Konidienproduktion unter *in vitro*-Bedingungen rasch abnimmt (siehe Abschnitte 2.3 und 4.2.1) und Sporen somit als Inokulumquelle nicht zur Verfügung standen, wurde eine Myzelsuspension von 0.3 g FW ml⁻¹ Wasser + 0.05 % (v/v) Tween 80 auf die Blattunterseite aufgetragen (JONES 1995). Zur Aufrechterhaltung einer nahezu 100 %igen Wassersättigung der Luft wurden bis 7 dpi Polyethylenröhren über die entsprechenden Blattflächen gestülpt.

Inokuliert wurde jeweils das jüngste voll entfaltete Blatt von *Musa*-Pflanzen mit einer Stengelhöhe von mindestens 20 cm bzw. 6 Wochen nach Überführung aus der *in vitro*- in die Bodenkultur. Die Bedingungen in der Klimakammer entsprachen während der gesamten Periode der Infektion 24°C, RH 70 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14/10 Stunden.

Die Bonitur der Krankheitssymptome erfolgte periodisch anhand des von FULLERTON und OLSEN (1995) entwickelten Schemas, dessen Stadien in Abhängigkeit von der Zeit zu einer Skala mit fünf Graden zur Klassifizierung der pilzlichen Virulenz sowie der pflanzlichen Reaktion führte (siehe Kapitel 2.4).

Die Behandlung des Wirt-Pathogensystems unter *in vitro*-Bedingungen mit dem Wirkstoff Tricyclazol[®] erfolgte in Übereinstimmung mit der Empfehlung zur Anwendung als systemisches Fungizid gegen *Pyricularia oryzae* im Reisanbau (Herr Kühn, Dow Elanco, pers. Mittlg.): Die Aufwandmenge der aktiven Substanz (750 mg l⁻¹) entspricht 4.0 mM und wurde vor der Inokulation des Pilzmyzels auf die gesamte Pflanze (alle Blätter, Ober- und Unterseite) appliziert (Wasser + 0.05 % [v/v] Tween 80). Da die Aufnahmerate des Wirkstoffes durch *Musa sp.*, die Verteilung in der Pflanze sowie die mögliche Metabolisierung und Transferrate zum *Mf*-Myzel als unbekannte Größen betrachtet werden müssen, wurde das Inokulum unmittelbar nach Auftragen auf die Blattunterseite nochmals mit Tricyclazol[®] besprüht.

3.3.2 Mikroskopische Untersuchungen von infizierten *Musa*-Kalli

Zur Nutzung homogener Zellformationen des Pathosystems *Musa sp./Mf* wurden Kalli verschiedener Sorten nach der in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Methode gewonnen und in Wägeschälchen mit 30 mm Höhe ungefähr 3 Wochen bei 26°C im Dunkeln vorgezogen. Die Inokulation erfolgte mit Myzel des Erregers auf die Oberfläche des Kallus (DONOVAN et al 1990). Die Inkubation wurde bei 26°C im Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 Stunden durchgeführt.

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten an *Musa/Mf*-Präparaten, die unmittelbar nach Auftreten der ersten Symptome an der Kallusoberfläche gewonnen wurden. Die Vor-

bereitung der Proben sowie die Elektronenmikroskopie wurden im Fachgebiet Pflanzenernährung der HU Berlin durchgeführt und bestanden in der Fixierung in 1% Osmiumsäure, Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe und Einbettung in Epoxydharz (Frau Ortmann, pers. Mittlg.). Die lichtmikroskopischen Analysen wurden an Semidünnschnittpräparaten (2 µm Schichtdicke) mit dem Durchlicht-Universalmikroskop Axioplan ohne weitere Anfärbung durchgeführt. Die Ultradünnschnitte (50 - 80 nm Schichtdicke) wurden am Ultramikroton zur weiteren Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Zeiss EM 9 (Beschleunigungsspannung 60 kV, Auflösung 1.5 nm) hergestellt und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

3.3.3 Applikation von *Mf*-Metaboliten in *Musa*-Blattgewebe

Zur Charakterisierung der Wirkungen von *Mf*-Metaboliten auf verschiedene *Musa* cv in der Zone primären Kontaktes zwischen Wirt und Pathogen wurde die „leaf-puncture-wound overlay technique“ in Anlehnung an MOLINA und KRAUSZ (1989) und STIERLE et al (1991, 1992) angewandt. Diese bestand im Durchstoßen des Blattgewebes mit einer sterilen Nadel und der darauffolgenden Applikation der in 5 % (v/v) EtOH gelösten Metaboliten auf die Blattoberfläche. Teilweise wurde die pflanzliche Kutikula mit Hexan entfernt, um die Oberflächenspannung zu vermindern und die Kontaktfläche zu erhöhen. Die behandelten Blattstellen wurden beidseitig mit Petrischalen luftdicht verschlossen, um Transpirationsverluste zu vermeiden, und in der Klimakammer unter gegebenen Bedingungen (siehe Abschnitt 3.1) einer maximalen Strahlung ausgesetzt, da Licht sich als für die Symptomausprägung entscheidender Faktor herausstellte. Die Auswahl des zu behandelnden Gewebes orientierte sich an der größtmöglichen Homogenität aller in den Versuch einbezogenen Pflanzen verschiedener *Musa* cv, insbesondere im Hinblick auf das Alter der Gesamtpflanze, das physiologische Alter des Blattgewebes und des Ernährungs- und Wasserversorgungszustandes (YODER 1981). Jede Punktierung wurde dreimal in den Interkostalfeldern jedes Blattes wiederholt, und die Anzahl der Pflanzen pro Variante betrug $n = 3$. Die eingesetzte Höchstkonzentration wurde schrittweise verdünnt bis zur Lösungsmittelkontrolle (5 % Ethanol). Zur besseren Vergleichbarkeit der physiologischen Wirkungen verschiedener Metabolite erfolgte die Angabe der Konzentration als molare Größe.

Alternativ wurde die von LEPOIVRE und ACUNA (1990) beschriebene „leaf disk infiltration technique“ angewandt, die durch den Einsatz der Vakuuminfiltration die Einwirkung pilzlicher Metaboliten auf pflanzliches Gewebe verbessern soll. Dazu wurden jeweils 20 Blattstücke von circa 0.64 cm² mit dem Korkbohrer ausgestanzt, bei 500 mbar mit der Probensubstanz in 2 %iger ethanolischer Lösung infiltriert, für 24 Stunden bei 25°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert und nach dem Filtern in jeweils 10 ml destilliertem Wasser nochmals 24 Stunden inkubiert. Die Messung der Leitfähigkeit stellte ein Maß für den Elektrolytverlust zerstörter Zellen dar. Als Kontrollen dienten durch Kryoklastik (-20°C) abgetötete Zellgewebe bzw. ethanolische Lösung (2 %) ohne Substanz.

4 Ergebnisse

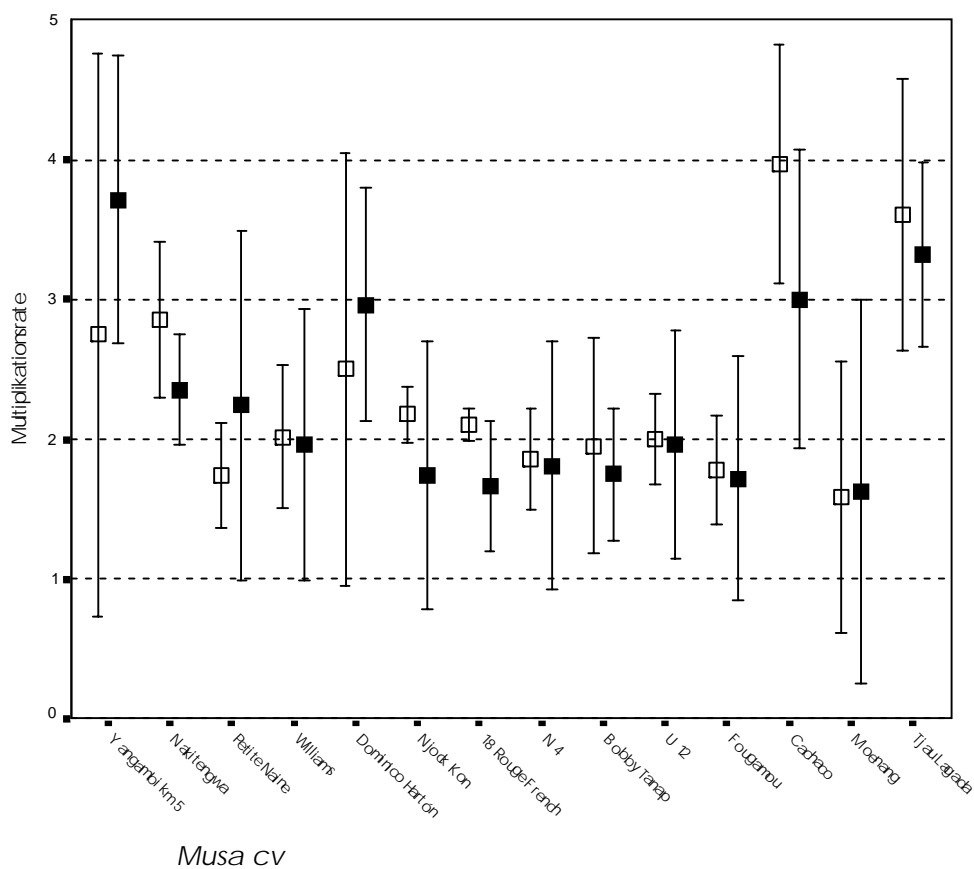
Die Darstellung der Ergebnisse folgt der in den vorangegangenen Kapiteln gewählten Gliederung in die Abschnitte zur Wirtspflanze, zum Pathogen und zum Pathosystem *Musa sp/Mf*. Dadurch soll die Zuordnung eigener Versuchsergebnisse zu den eingesetzten Materialien und Methoden sowie der Literaturübersicht erleichtert werden.

4.1 Wirtspflanze *Musa sp*

4.1.1 *In vitro*-Kultur von *Musa sp*

Die *in vitro*-Kultur von *Musa cv* diente dem Erhalt und der Vermehrung von Wirtspflanzen verschiedener Sorten, die eine unterschiedliche Reaktion gegenüber dem Erreger *Mf* und dessen Metaboliten aufweisen, sowie zur Gewinnung von Sekundärstoffen aus pflanzlichen Geweben und deren weiterer Untersuchung.

Zur Identifizierung geeigneter Sorten mit maximalen Vermehrungsraten wurden die Multiplikationsraten der *Musa cv*-Acquisitionen auf MS-Nährmedium mit unterschiedlicher Wachstoffsstoffkonzentration und -zusammensetzung bestimmt (siehe Anhang, Tabelle 13):



(Vitaminzusammensetzung: ■ VUYLSTEKE 1989, □ OKOLE 1995, siehe Anhang, Tabelle 13)

Abb. 4 Multiplikationsraten von *Musa cv* auf MS-Nährmedium mit unterschiedlicher Vitaminsatzzusammensetzung drei Wochen nach Umsetzen (n = 12, Mittelwert ± SD)

Die Vermehrungsraten jedes abgetrennten und vereinzelt inkubierten Explantates („bud“) lagen zwischen 1.5 und 4.0 Sproßtrieben, wobei die Variationen bei einigen Sorten (Yangambi km 5, Dominico Hartón, Moenang) insbesondere bei Zugabe der von OKOLE (1995) angegebenen Wuchsstoffzusammensetzung hohe Werte annahmen. Die Kriterien zur Auswahl der Sorten, die in der weiteren experimentellen Arbeit jeweils die bekannten Reaktionen gegenüber *Mf* repräsentieren sollten, waren hohe Multiplikationsraten in Verbindung mit dem geringen Auftreten unerwünschter Kallusbildung und Verbräunung.

Tab. 7 Charakteristika der *in vitro*-Kultur ausgewählter *Musa cv* nach drei Wochen Inkubationsdauer

<i>Musa cv</i>	Genom	Reaktion gegen- über <i>Mf</i>	Multiplikationsrate (MS- Medium nach VUYLSTEKE 1989)	Kallus- bildung	Verbräunung
Yangambi km 5	AAA	HR	3.71	+	+
Dominico Hartón	AAB	S	2.96	++	++
Cachaco	ABB	PR	3.00	-	+

- nicht aufgetreten, + wenig, ++ mittelmäßig

Bei einem dreiwöchigen Zyklus des Teilens und Umsetzens multipler Schößlinge auf frische Nährmedien wurde bei den gegebenen Licht- und Temperaturbedingungen keine Veränderung der Vermehrungsrate über einen Zeitraum von mehr als drei Jahren festgestellt. Wachstumsanomalien an differenzierten Geweben (kolloide Bereiche, Hypertrophien) traten verstärkt bei Dominico Hartón auf und wurden beim periodischen Umsetzen entfernt.

Die weiteren Stufen der *in vitro*-Kultur der vereinzelt Schößlinge werden in Abbildung 5 dargestellt: Zur Gewinnung von *Musa*-Ganzpflanzen wurden die differenzierten Sproßmeristeme auf MS-Regenerationsmedium gesetzt und entwickelten innerhalb von drei Wochen ein vollständiges Wurzelsystem; vor dem Auspflanzen (*ex vitro*) wurde auf dem Mineralstoff- und Saccharosereduzierten MS-Hardening-Medium der Übergang zur Photoautotrophie vollzogen. Morphologische Anomalien, die als somaklonale Variationen angesprochen wurden, traten nach dem Auspflanzen in Bodensubstrat auf; am häufigsten wurde bei Pflanzen im Drei- bis Vier-Blattstadium der Sorte Dominico Hartón das Phänomen der Gelbstreifung beobachtet.

Die Gewinnung von Einzelzell- und Kalluskulturen erfolgte aus frisch geschnittenem meristematischem Gewebe, das nach einer kurzen Phase zur Bildung von Abschlußgewebe in SH-Flüssigmedium (Kallusbildung) bzw. MS-Multiplikationsmedium (Zellsuspension) übertragen wurde. Bei der periodischen Evaluierung der Zellsuspensionen unter Anfärbung mit Evans Blue konnten lebende, sich teilende Einzelzellen beobachtet werden, diese waren jedoch in keiner der drei *Musa*-Sorten embryogen (Abbildung 5c).

Die Kalli in Flüssigkulturen wiesen bei einem Anfangsdurchmesser von > 5 mm einen sichtbaren Massezuwachs auf und wurden zur Inokulation mit *Mf*-Myzel auf geliertes SH-Medium umgesetzt (siehe Abschnitt 4.3.2, Abbildung 31).

4.1.2 Enzymaktivität der Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL)

Als zentrales Enzym am Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel der Pflanze wurde die PAL-Aktivität durch UV-Absorption des entstehenden Produktes Zimtsäure (CA) gemessen. Die Elizitierung erfolgte mit dem Antibiotikum Kanamycin sowie durch Inokulation mit *Mf*-Myzel, wobei teilweise der Wirkstoff Trizyclazol® zugegeben wurde.

Die Ergebnisse der Vorversuche mit verschiedenen Methoden der Probenvorbehandlung und der UV-Messung bei unterschiedlichen Wellenlängen zeigten die Notwendigkeit einer intensiven Entfärbung der Pflanzenproben durch Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) oder Aktivkohle; die Messungen erfolgten bei den in wässrigem Puffer gemessenen Absorptionsmaxima der reinen Substanzen (CA: $\lambda_{\max} = 272$ nm, Proteinkomplex: $\lambda_{\max} = 629$ nm).

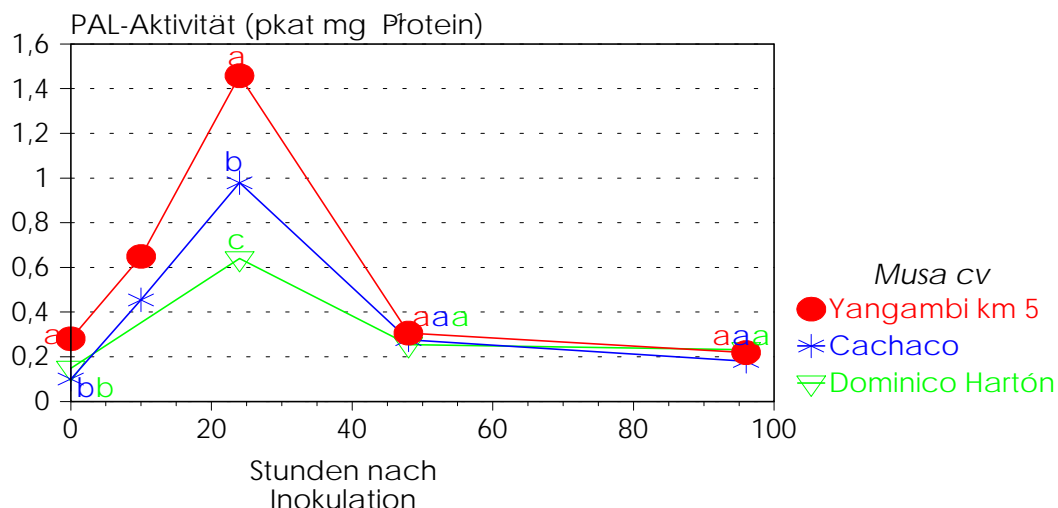


Abb. 5 PAL-Aktivität verschiedener *Musa cv* nach Inokulation mit *Mf* (n = 3, gleiche Buchstaben bezeichnen nichtsignifikante Unterschiede nach Duncan, p = 0.05)

Durch die Anwendung des Antibiotikums Kanamycin konnte keine Aktivierung von PAL nachgewiesen werden.

In der HR-Sorte Yangambi km 5 war die PAL-Aktivität gegenüber den beiden anfälligeren Sorten vor Inokulation deutlich erhöht. Im Verlaufe der Infektion stiegen die Aktivitäten aller drei *Musa cv* deutlich an und erreichten ihr Maximum 24 Stunden nach Inokulation, sanken aber innerhalb von 48 Stunden auf ihr ursprüngliches Niveau vor Inokulation und verbleiben bis zum Ende der Meßperiode bei Werten um 0.2 pkat mg⁻¹Protein. Das Ausmaß der Aktivierung von PAL in *Musa cv* steigt also als Reaktion auf eine Inokulation mit dem Erreger *Mf* mit dem Grad der Resistenz gegenüber dem Pathogen.

Um den Einfluß des pilzlichen Sekundärmetaboliten 2,4,8-THT auf die pflanzliche Erkennungs- und/oder Abwehrreaktion zu untersuchen, wurde der für den Pentaketid-Metabolismus des Erregers wichtige Wirkstoff Tricyclazol[®] eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.2). Die PAL-Aktivität in den beiden anfälligen Sorten Cachaco (PR) und Dominico Hartón (S) zeigte keine Veränderung gegenüber der inokulierten Kontrolle ohne den Wirkstoff; im Falle von *Musa cv* Yangambi km 5 konnte eine Aktivierung in höherem und anhaltenderem Maße festgestellt werden:

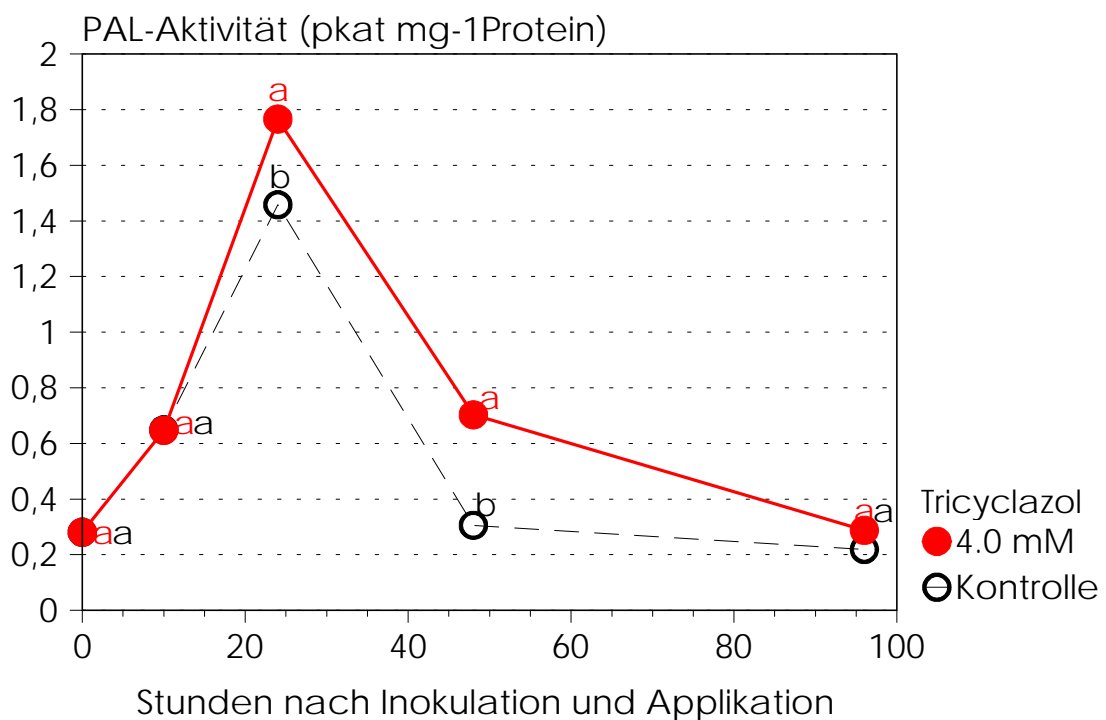


Abb. 6 PAL-Aktivität von *Musa cv* Yangambi km 5 nach Inokulation mit *Mf* und Applikation des Wirkstoffes Tricyclazol[®] (n = 3, gleiche Buchstaben bezeichnen nichtsignifikante Unterschiede nach Duncan, p = 0.05)

4.1.3 Sekundärmetaboliten zur Abwehr pilzlicher Erreger

Zur Extraktion von pflanzlichen Sekundärmetaboliten wurden verschiedene Verfahren angewandt, die die Gewinnung von Apoplastenflüssigkeit voraussetzten. Die in Kapitel 3.1.3 beschriebene Methode der Infiltration wässriger Pufferlösung und nachfolgender Zentrifugation ergab allerdings nur minimale Ausbeuten ($< 10 \mu\text{l g}^{-1}$ FW), die auch durch vermindertes Infiltrationsvakuum und erhöhte Zentrifugenbeschleunigung nicht wesentlich gesteigert werden konnten, so daß die „facilitated diffusion method“ nach KEEN (1978) zur Anwendung kam. Die so gewonnenen Rohextrakte wurden durch TLC getrennt und angefärbt bzw. mit einer Sporensuspension aus *Cladosporium sp* inokuliert, wobei folgende Substanzbande sichtbar wurden:

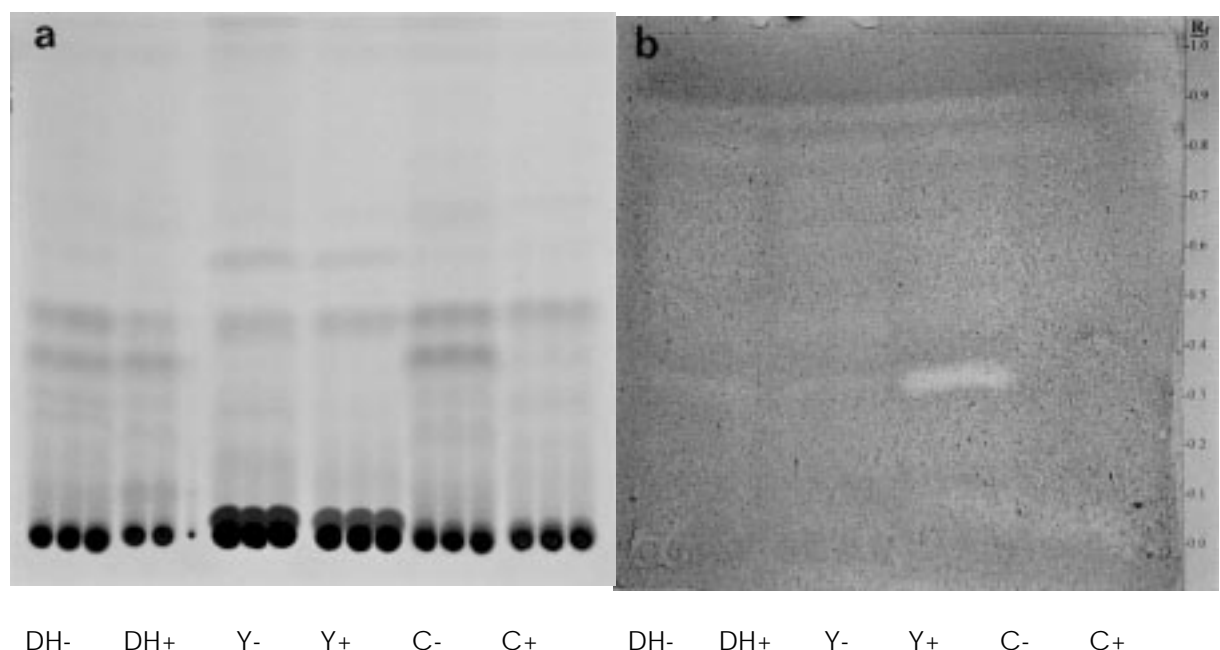


Abb. 7 Trennung von Sekundärmetaboliten verschiedener *Musa cv* (DH = Dominico Hartón, Y = Yangambi km 5, C = Cachaco) durch TLC nach Elizitierung mit Kanamycin (= ohne Kanamycin-Behandlung, + = mit Kanamycin-Behandlung): a. Entwicklung mit Schwefelsäure, $\lambda = 254 \text{ nm}$; b. Nach Inkubation mit *Cladosporium sp* (4 dpi)

Die Trennung pflanzlicher Extrakte auf Silica unter Verwendung des TLC-Systems B (siehe Anhang, Tabelle 18) zeigte eine sehr dichte Abfolge von UV-absorbierenden Substanzen, die allerdings keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den drei *Musa cv* erkennen ließen. Nach Inokulation und der viertägigen Inkubation der entwickelten TLC-Platten mit einer *Cladosporium sp*-Sporensuspension in der feuchten Kammer wurde eine deutliche Zone verminderten Myzelwachstums im Extrakt von Yangambi km 5 nach Elizitierung sichtbar ($R_f \sim 0.35$), die auf das Vorhandensein antimikrobieller, postinfektionell gebildeter Substanzen hinweist. Diese wurden auf einer parallel entwickelten Platte detektiert, extrahiert und in das

HPLC-System B (siehe Anhang, Tabelle 19) reinjiziert; dabei konnte ein deutlicher Peak bei $t_R = 15.82$ min detektiert werden, der zwei Absorptionsmaxima ($\lambda = 215$ und 280) aufweist:

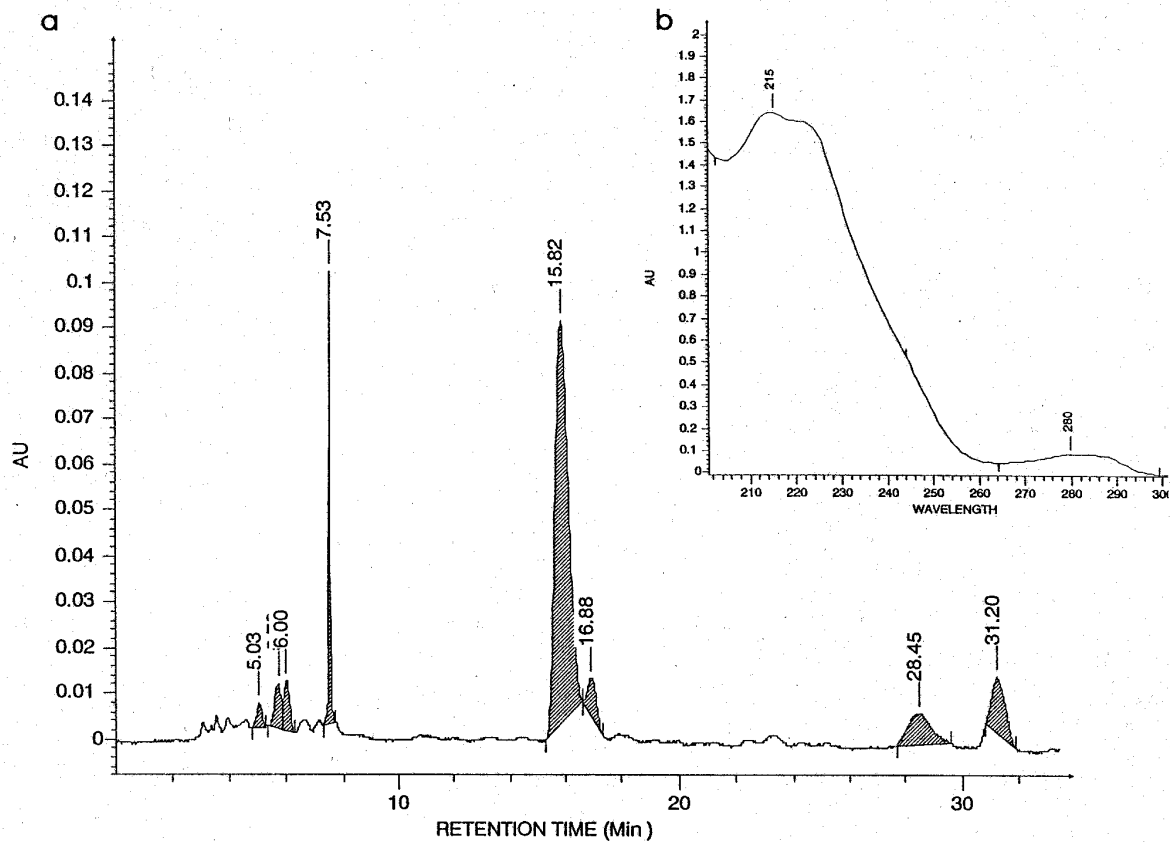


Abb. 8 Chromatographische Kennwerte eines aus *Musa* cv Yangambi km 5 nach Elizitierung mit Kanamycin isolierten TLC-Spots ($R_f = 0.35$) mit antimikrobieller Wirkung:

a. Chromatogramm ($\lambda = 280$ nm); b. UV-Spektrogramm ($t_R = 15.82$ min)

4.2 Pathogen *Mf*

4.2.1 *In vitro*-Kultur

Die *in vitro*-Kultur von *Mf* diente der Gewinnung von Inokulationsmaterial für die Synthese metabolischer Produkte des Sekundärstoffwechsels sowie der Infektion von *Musa* cv. Die morphologischen Charakteristika von Myzel und Konidien sind in Abbildung 10 a und b dargestellt.

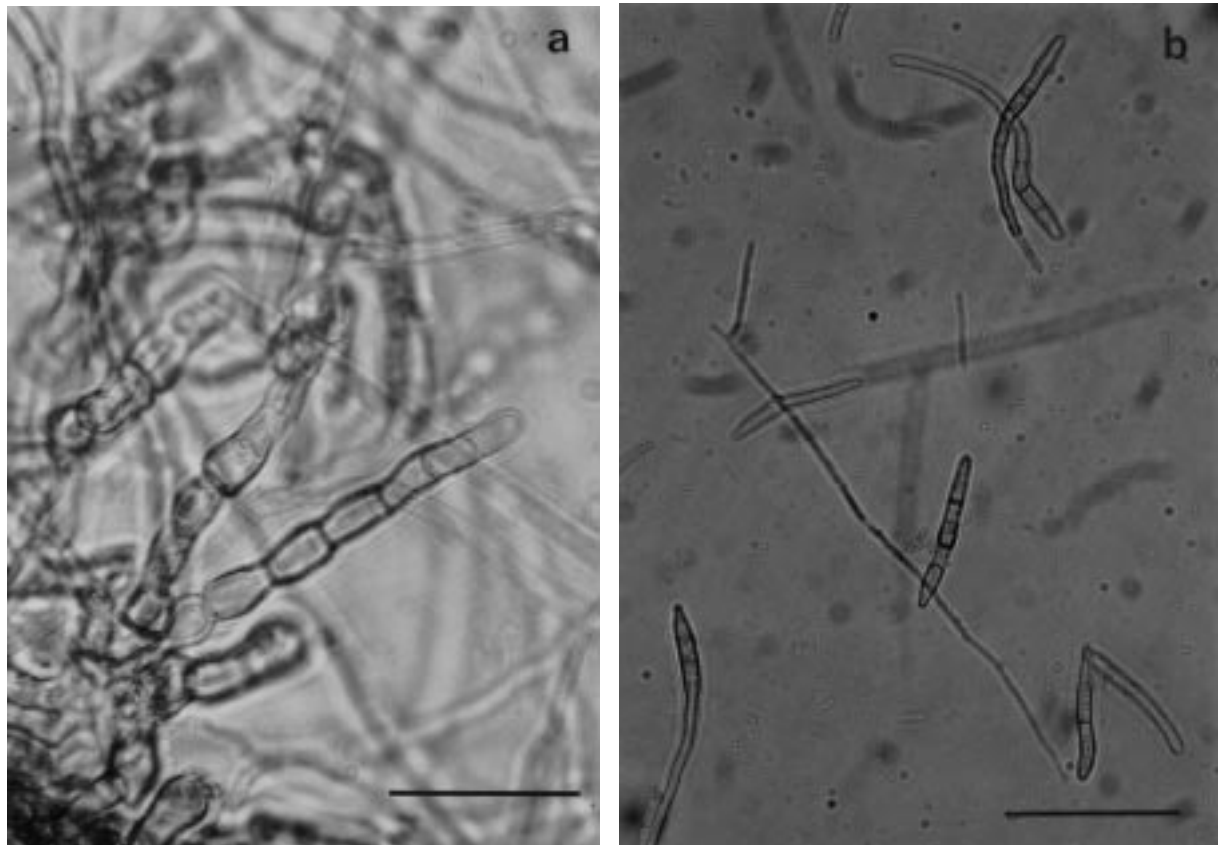


Abb. 9 *Mf*-Myzel unter *in vitro*-Bedingungen: a. Konidienträger (Vergr. 1500x, Balkenlänge = 20 µm); b. Konidiensuspension (Vergr. 600x, Balkenlänge = 50 µm)

Um die Produktion von Konidien zur Verwendung als natürliches Inokulum zu untersuchen, wurde ein frisch gewonnenes Isolat aus Honduras (*Mf*-HON) auf verschiedene Nährböden transferiert und die Anzahl der gebildeten Konidien periodisch bestimmt (Tabelle 8) und zur Gesamtmenge produzierter Konidien kumuliert (Abbildung 11).

Tab. 8 Periodische Produktion von *Mf*-Konidien auf verschiedenen Nährmedien

Nährboden	Tage nach Inokulation (dpi)							
	10	15	20	25	30	35	40	50
	Anzahl produzierter Konidien (n 10 ⁴ 58 cm ⁻²)							
M-1D	2,7 a	4,6 a	4,8 a	8,5 a	4,2 a	3,4 a	1,8 a	1,8 a
Musa 50%	1,9 ab	2,2 ab	2,0 b	3,2 b	2,1 b	2,7 ab	1,3 a	0,5 c
GPA	1,8 ab	2,4 ab	1,5 bc	3,3 b	2,0 b	2,3 b	0,9 bcd	0,3 c
SNA	0,9 b	0,7 b	1,3 bc	2,7 bc	2,8 ab	2,7 ab	1,7 a	1,6 ab
Musa 12,5%	1,1 ab	0,9 b	0,8 bc	1,6 bcd	1,6 b	1,3 c	1,1 bcd	0,5 c
PDA	0,8 b	0,6 ab	1,0 bc	0,6 d	0,5 c	0,8 c	0,6 cd	0,3c
H₂O	0,4 b	0,3 b	0,5 c	0,9 d	1,2 b	1,2 c	1,2 abc	0,6 b

Anmerkungen: n = 4, gleiche Buchstaben innerhalb einer Spalte verweisen auf nichtsignifikante Unterschiede (*H*-Test nach Kruskal und Wallis, $\alpha = 0.05$)

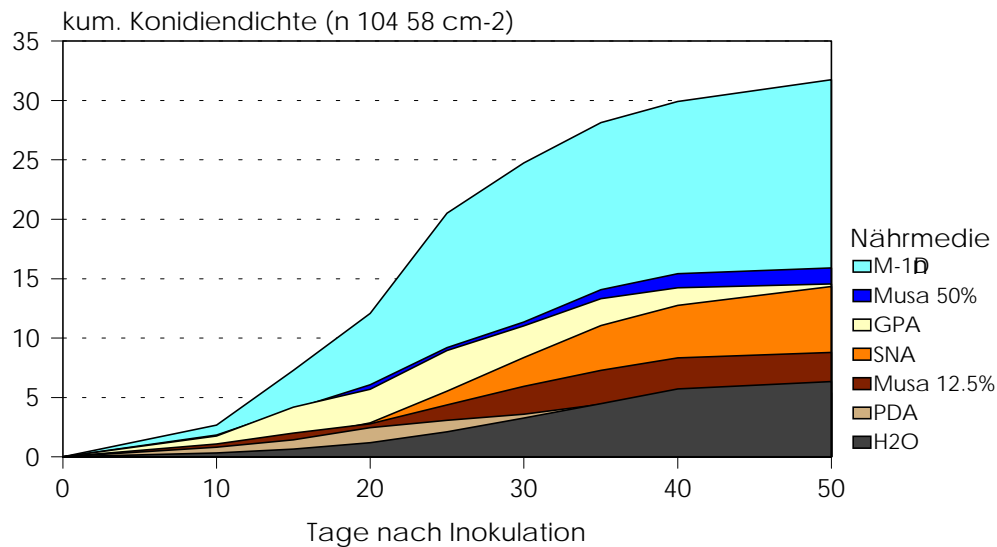


Abb. 10 Konidienproduktion (kumuliert aus Daten der Tabelle 8) von *Mf* auf verschiedenen Nährmedien im Verlaufe der Inkubationsperiode

Die Produktion von Konidien ist in starkem Maße abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums, wobei auf dem komplexen Substrat M-1D in der Phase zwischen 10 und 35 dpi die höchste Produktion erreicht wurde. Auf dem unter Verwendung von Bananenblattextrakten ohne weitere Nährstoffquellen zubereiteten Medium wurde eine konzentrationsabhängige (*Musa* 50% >> *Musa* 12.5%) Konidienproduktion ermittelt, die aber ebenso wie auf GPA und SNA deutlich unter dem auf M-1D erreichten Niveau verblieb. Insgesamt ist die starke Abnahme produzierter Konidien auf allen getesteten Nährböden zum Ende des Versuchszeitraumes offensichtlich. Aus diesem Grund wurden die Inokulationen flüssiger Nährmedien sowie die Infektion von *Musa*-Blattgewebe mit Myzelpräparationen durchgeführt.

Die flächenhafte Ausdehnung von *Mf* auf Nährböden ist auch bei Verwendung von Konidien als Inokulumquelle nur sehr gering (Abbildung 12), das Myzel wächst vielmehr kompakt in vertikaler Richtung mit hellgrauen bis dunkelbraunen Lufthyphen und sehr dunklem Grundmyzel.

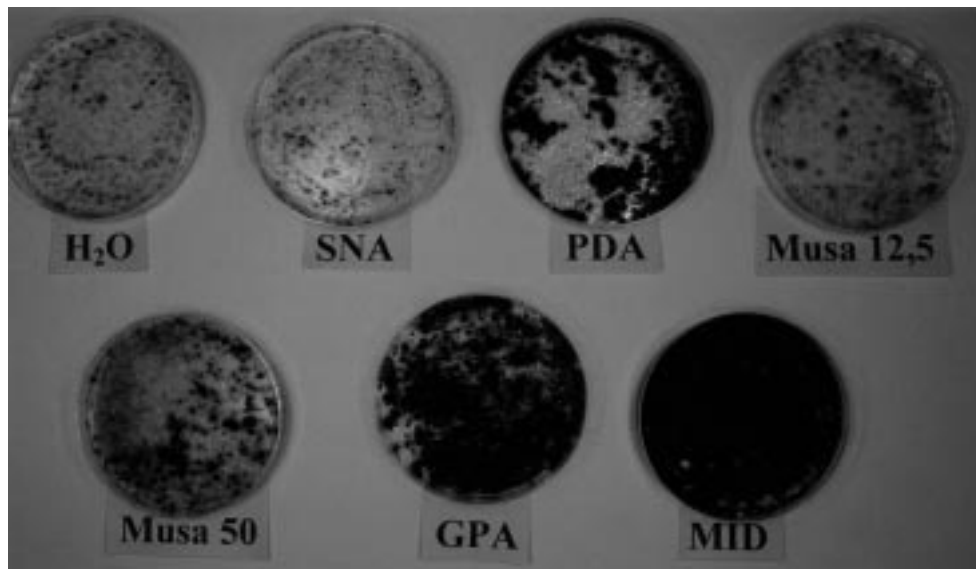


Abb. 11 Myzelverteilung von *Mf*-HON auf verschiedenen Nährböden (50 dpi)

Der Wirkstoff Tricyclazol[®] bewirkt in steigenden Dosen (10 und 1000 μ M) eine je nach *Mf*-Isolat unterschiedliche Verfärbung des unmittelbar dem Myzel anliegenden Nährbodens (Abbildung 13); die intensivste Verfärbung wurde bei den Isolaten HON, 294 und 309 festgestellt. Der Biomassezuwachs ist auf dem mit 1000 μ M Tricyclazol[®] enthaltendem PDA bei allen Isolaten deutlich reduziert.

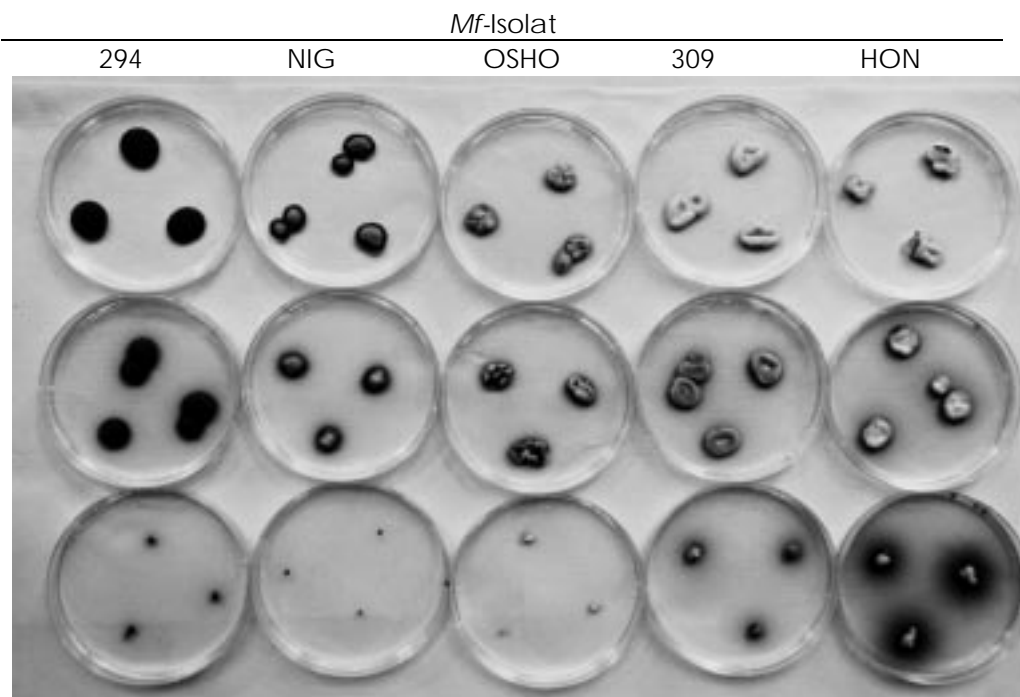


Abb. 12 Myzelwachstum von *Mf*-Isolaten und Farbreaktion auf PDA mit verschiedenen Konzentrationen von Tricyclazol[®] (oben: ohne; Mitte: 10; unten: 1000 ppm Tricyclazol)

Der Zuwachs an Trockenmasse sowie der pH-Wert bei Inkubation von *Mf* in flüssigem M-1D-Nährmedium wiesen folgende Entwicklung in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen auf:

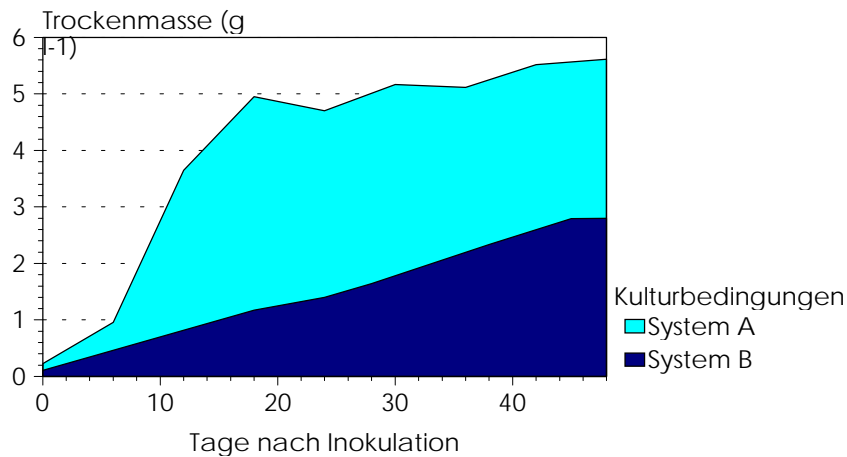


Abb. 13 Entwicklung der Myzeltrockenmasse im Verlauf der Inkubation von *Mf*-NIG in M-1D-Nährmedium bei Verwendung unterschiedlicher Kulturgefäße (**System A**: flaches Kulturgefäß, Luftaustausch, gute Durchmischung; **System B**: Rundkolben, Luftabschluß, geringe Durchmischung); n = 4, Inokulationsgewicht = 225 mg.

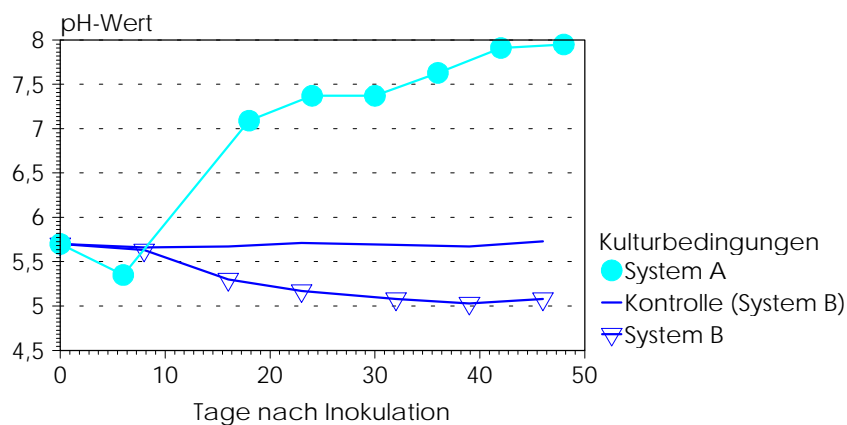


Abb. 14 Entwicklung des pH-Wertes im Verlauf der Inkubation von *Mf*-NIG in M-1D-Nährmedium bei Verwendung unterschiedlicher Kulturgefäße (System A, B: siehe Abbildung 14; Kontrolle: nicht inokuliert); n = 4, Inokulationsgewicht = 225 mg.

Bezüglich des Einsatzes von 10 μM Tricyclazol[®] ist keine Beeinflussung der Trockenmassenzunahme oder des pH-Wertes von *Mf*-Nährsuspensionen feststellbar. Bei geringer Luftversorgung zeigt die Zunahme der Trockenmasse einen annähernd linearen Verlauf bis zum Ende der Inkubationsperiode, wohingegen eine intensivere Versorgung mit Luft zu einer starken Zunahme in den ersten 18 Tagen führt. Die Myzelmasse am Ende der Inkubationsperiode übersteigt das Inokulumgewicht bei geringer Luftzufuhr um den Faktor 100, mit intensiver Luftzufuhr um den Faktor 200. Der pH-Wert der Kulturfiltrate sinkt ohne weitere Luftzufuhr in der ersten Phase der Inkubation um pH 0.5, bei Gefäßen mit Luftaustausch steigt der pH-Wert auf bis zu 7.7 am Ende der Inkubationsperiode von 45 Tagen.

4.2.2 Sekundärmetaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges

4.2.2.1 Probenaufbereitung durch TLC, SPE und HPLC

Die Gesamtausbeute an nicht weiter verdampfbarem Rohextrakt von *Mf* betrug nach 35 Tagen zwischen 35 bis 38 mg l⁻¹ bei dreimaliger Extraktion mit Ethylacetat (1:1 v/v). Die Auftrennung der Rohextrakte erfolgte zunächst durch TLC (System A, siehe Anhang, Tabelle 17), wodurch eine Quantifizierung einzelner Substanzen allerdings nicht in hinreichendem Maße erreicht werden konnte.

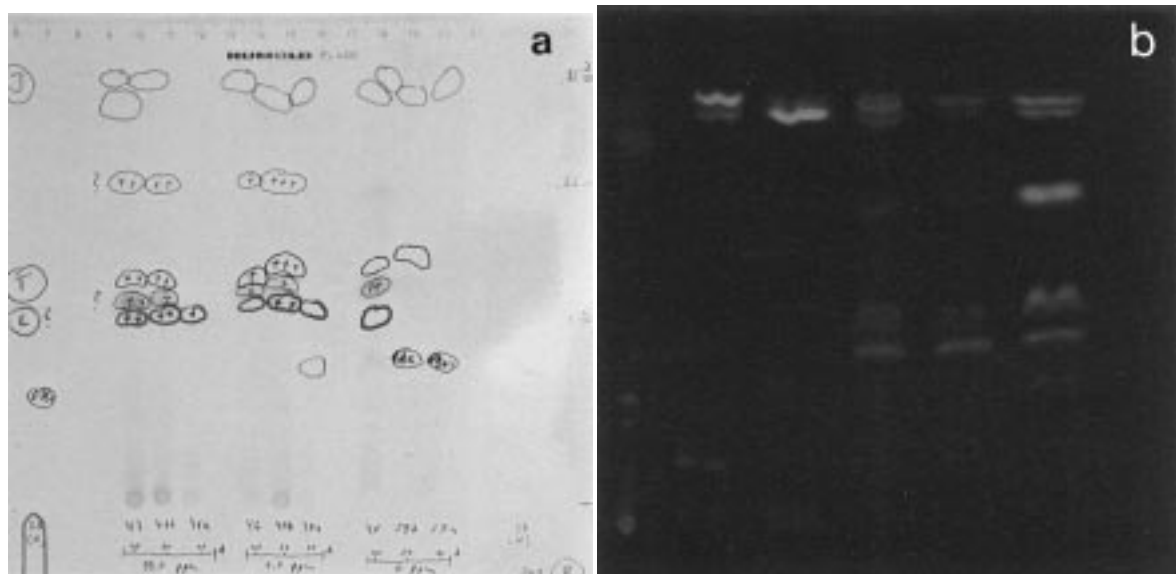


Abb. 15 Trennung von Rohextrakten aus *Mf*-Kulturfiltraten durch TLC (System A):

a. Tageslicht (mit Auswertungsnotizen); b. UV-Licht, $\lambda = 254 \text{ nm}$

Um die Substanzen des Pentaketid-Biosyntheseweges ohne aufwendige und verlustbehaftete Transfers von der TLC-Silicaschicht in die HPLC zu erfassen, wurde eine Methode der Festphasenextraktion (SPE) zur Aufreinigung der Proben entwickelt: Die Ergebnisse der getesteten Systeme mit unterschiedlichen stationären und mobilen Phasen sind in Abbildung 17 dargestellt.

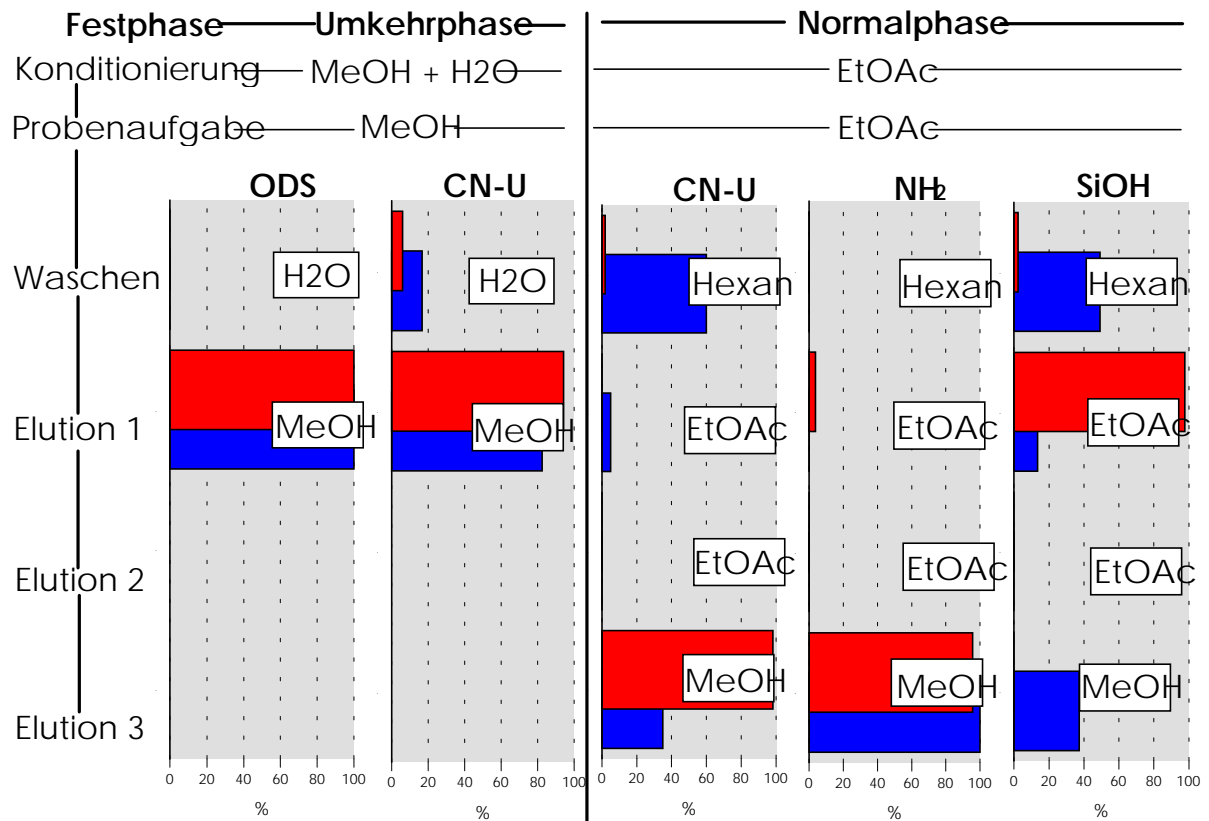


Abb. 16 Elution der Pentaketidmetaboliten 1,5-DHN und Juglon zur Bewertung der untersuchten Festphasensysteme (ODS = Oktadecylsilan, CN-U = Cyanopropylsilan, NH₂ = Aminopropylsilan, SiOH = Silica): Anteil wiedergewonnener Substanzen in den verschiedenen Stufen der Festphasenextraktion (| 1,5-DHN, | Juglon); weitere Angaben im Text

Zur Methodenentwicklung wurden die beiden Testsubstanzen 1,5-Dihydroxynaphtalin (1,5-DHN) und Juglon aufgrund ihrer Retentionszeiten im HPLC-System A (siehe Anhang, Tabelle 19: t_R [1,5-DHN] = 10.9 min, t_R [Juglon] = 18.6 min) als repräsentativ für die relevanten Pentaketidmetaboliten aus *Mf* ausgewählt. Dabei erwies sich das Normalphasensystem unter Verwendung von Aminopropylsäulen (NH₂) als geeignet für die weitere Analyse, da beide Substanzen in der letzten Elutionsstufe gemeinsam mit der mobilen Phase Methanol eluiert wurden. Alle folgenden Ergebnisse wurden unter Anwendung von SPE-NH₂ durchgeführt, wobei im Anschluß an die Auswaschung mit Hexan die Analyte sofort mit Methanol eluiert wurden. Eine synoptische Darstellung der Gewinnung, Reinigung, Trennung und Weiterverwendung der *Mf*-Metaboliten aus Kulturfiltraten ist im Anhang (Abbildung 45) enthalten.

Die folgende Tabelle faßt die Ausbeute an Rohextrakten und ausgewählten Metaboliten in den verschiedenen Stufen der Aufbereitung zusammen.

Tab. 9 Gewinnung von Rohextrakten aus Nährlösungen von *Mf*-CAM und Gehalt ausgewählter Sekundärmetaboliten in verschiedenen Stufen der Probenaufbereitung

Extraktionsschritt	Rohextrakt		2,4,8-THT		Juglon
	mg l ⁻¹	kum. %	µg l ⁻¹	kum. %	µg l ⁻¹
EtOAc 1	23,7	66,4	246,4	95,3	1,1
EtOAc 2	7,1	86,4	11,8	99,7	n.n.
EtOAc 3	3,1	94,9	0,77	100,0	n.n.
<hr/>					
% des Gesamtgehaltes im Rohextrakt					
SPE: NH₂			98 - 100	90 - 95	
TLC: Silica			40 - 50	n.n.	
HPLC-Reinjektion			88 - 96		

n.n. = nicht nachgewiesen

Der Übergang des Analyten 2,4,8-THT aus der wässrigen in die organische Phase betrug K (Nernst'sche Konstante) = 19; aufgrund dieses Ergebnisses wurden die *Mf*-Kulturfiltrate zweimal mit EtOAc extrahiert und damit 99.7 % des gesamten in der Probe enthaltenen Metaboliten 2,4,8-THT gewonnen.

Die nachfolgend dargestellten HPL-Chromatogramme von *Mf*-Extrakten nach SPE-NH₂ sowie die spektrographischen Kennwerte von 2,4,8-THT belegten die methodische Validität sowie den Reinheitsgrad der verwendeten Substanzen.

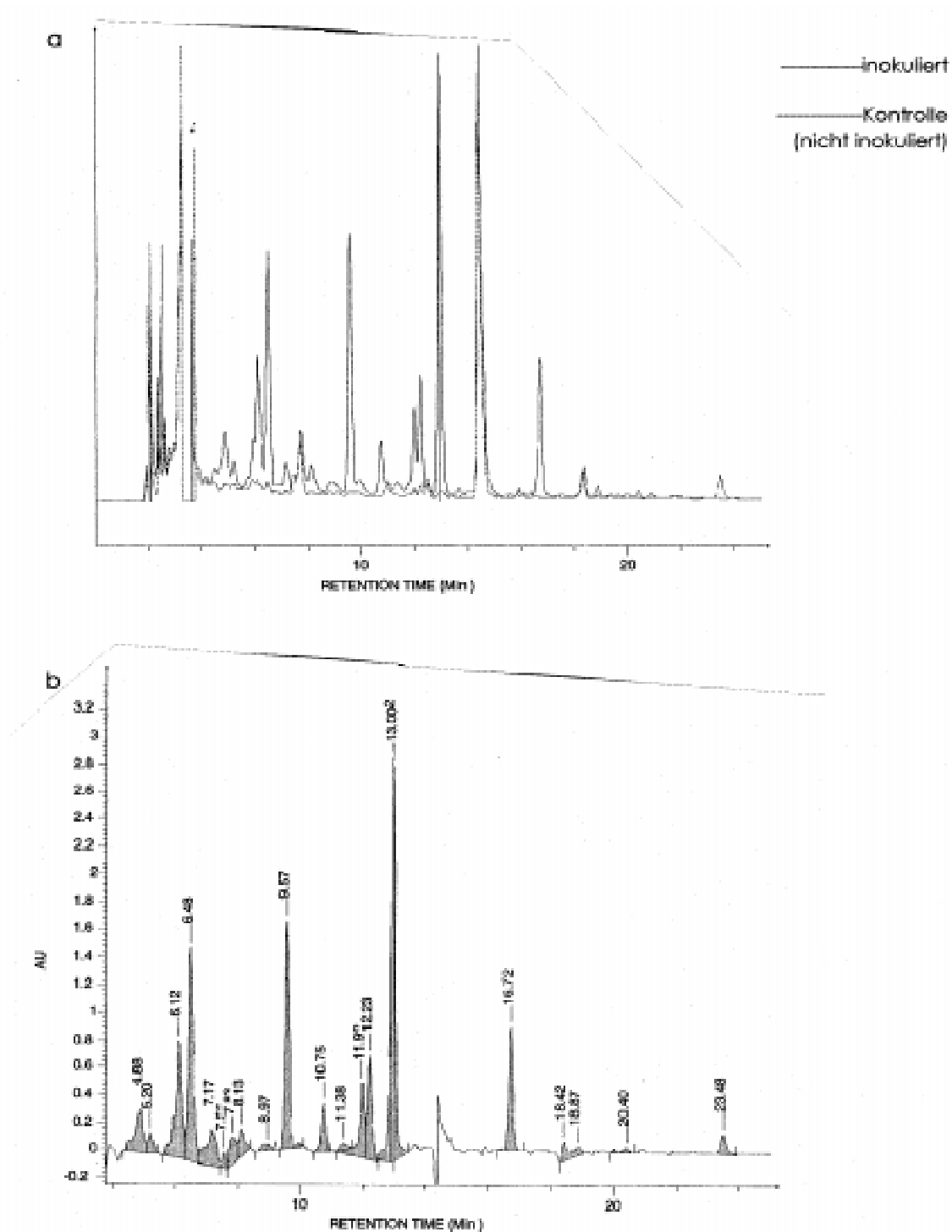


Abb. 17 HPL-Chromatogramme eines *Mf*-Extraktes nach SPE-NH₂ :

a. Inokulierte Nährsuspension (—) und nicht inokulierte Kontrolle (-----) nach 45 Tagen Inkubation; b. Ergebnis der Subtraktion (inokuliert minus Kontrolle)

Tab. 10 Peakbericht des HPL-Chromatogrammes (Abbildung 18b) aus *Mf*-Extrakten mit identifizierten Substanzen und chromatographischen Kennwerten

#	RT	Height	Width	Type	Area	%Area	Name	Plate N
1	4.88	0.3248	0.244	BV	506425	5.06		2224
2	5.20	0.1430	0.175	VB	152396	1.28		4910
3	6.12	0.8905	0.185	BV	1263657	10.59		6057
4	6.48	1.5581	0.165	VV	1694164	14.20		8577
5	7.17	0.2701	0.306	VB	801819	5.04		3043
6	7.55	0.1174	0.130	BB	90384	0.76		18563
7	7.83	0.2040	0.287	BV	308408	2.58		4436
8	8.13	0.1994	0.232	VB	277193	2.32		5799
9	8.97	0.0486	0.267	BB	88883	0.74		5418
10	9.57	1.6522	0.147	BB	1588879	13.15	2,4,8-THT	23672
11	10.75	0.3552	0.139	BB	326282	2.73		33035
12	11.38	0.0424	0.242	T	63078	0.53		12286
13	11.98	0.5519	0.157	BV	689255	5.78		38361
14	12.23	0.7585	0.152	VB	739361	6.20		35938
15	12.92	2.8266	0.049	BB	1068986	8.96	Flavoblin	383402
16	13.00	2.8759	0.055	BB	1068856	8.96	3-HO-Juglb	306092
17	16.72	0.9005	0.134	BB	823821	6.91		85776
18	18.42	0.1430	0.158	BV	138067	1.16		75100
19	18.87	0.0672	0.367	VB	133874	1.12	Juglon	19148
20	20.40	0.0862	0.149	BB	57670	0.48		104058
21	23.48	0.1391	0.177	BB	171274	1.44		97622

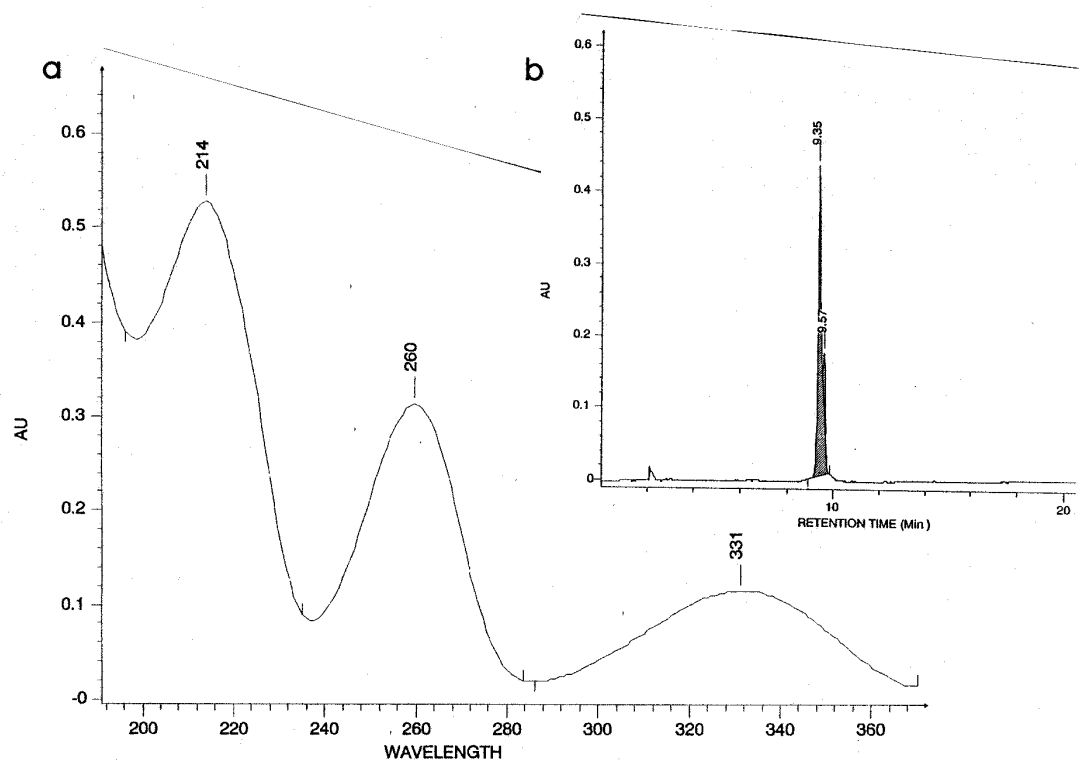


Abb. 18 HPL-Chromatogramm und spektrale Kennwerte von 2,4,8-THT:

- a. UV-Spektrogramm von 2,4,8-THT (UV-Scan des HPLC-Detektors, ca. 20 % MeCN);
- b. Peakreinheit nach Reinjektion von $t_R = 9.45$ min

Die weiteren isolierten Metabolite aus *Mf*-Rohextrakten sowie die Produkte der Thiele-Winter-Reaktion aus Juglon wurden anhand ihres Retentionsverhaltens und ihres UV-Absorptionsspektrums den in folgender Tabelle genannten Substanzen zugeordnet:

Tab. 11 Chromatographische und photometrische Charakterisierung von Hydro- und Naphtochinonen des Pentaketid-Metabolismus von *Mf*

<u>Substanz</u>	<u>Summenformel</u>	<u>MW</u>	<u>TLC</u>	<u>HPLC^c</u>			<u>λ_{\max}</u>
		Da	R _f	t _R	(k _i) ^d	α^e	(nm)
2,4,8-Trihydroxytetralon	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194	0.34 ^a	9.45	3.5	1.46	214, 260, 331
Flaviolin	C ₁₀ H ₆ O ₅	206	-	12.8	5.1	1.02	275, 325
3-Hydroxyjuglon	C ₁₀ H ₆ O ₄	190	0.40 ^b	13.2	5.2	1.23	240, 280, 420
2-Hydroxyjuglon	C ₁₀ H ₆ O ₄	190	0.67 ^b	15.6	6.4	1.23	285, 425
Juglon	C ₁₀ H ₆ O ₃	174	0.87 ^a	18.6	7.9		250, 330, 428

a TLC-System A (siehe Anhang, Tabelle 18)

b TLC-System D (siehe Anhang, Tabelle 18)

c HPLC-System A (siehe Anhang, Tabelle 19)

d Kapazitätsfaktorberechnung $k_i = t_i - t_0 / t_0$, mit $t_0 = 2.10$ min (Thioharnstoff)

e Selektivitätskoeffizient $\alpha = k_2 / k_1$ ($k_2 > k_1$)

4.2.2.2 Massenspektrometrische Identifikation

Die weitere Zuordnung der durch TLC oder HPLC getrennten Substanzen der *Mf*-Rohextrakte erfolgte durch Massenspektrometrie (MS) sowie deren Kopplung mit Gaschromatographie (GC-MS).

Nach TLC-Trennung, Wiederaufnahme in Lösungsmittel und Vakuumverdampfung mehrerer Substanzflecken konnte die in TLC-System A bei $R_f = 0.34$ detektierte Fraktion als 2,4,8-Trihydroxytetralon (2,4,8-THT) mit einer Masse (m/z) von 194.05 und einer Ausbeute von 14.8 % identifiziert werden; weitere deutliche Massepeaks, etwa bei $m/z = 176.0$, können als Fragmente des 2,4,8-THT (Wasserabspaltung) interpretiert werden (siehe Abbildung 20).

Eine weitere Auftrennung und MS-Bestimmung des durch TLC vorgereinigten Extraktes erfolgte durch die Koppelung GC/MS nach Derivatisierung der Substanzen mit BSTFA. Dabei entstanden die in Abbildung 21 detektierten Fragmente des 2,4,8-THT.

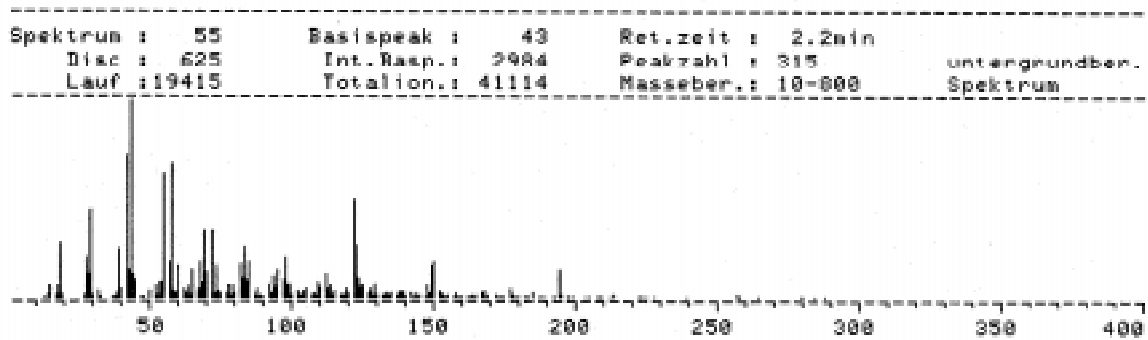


Abb. 19 Massenspektrogramm bei 160°C ($t = 2.2$ min) eines TLC-Spots ($R_f = 0.34$) aus *Mf*-Rohextrakten

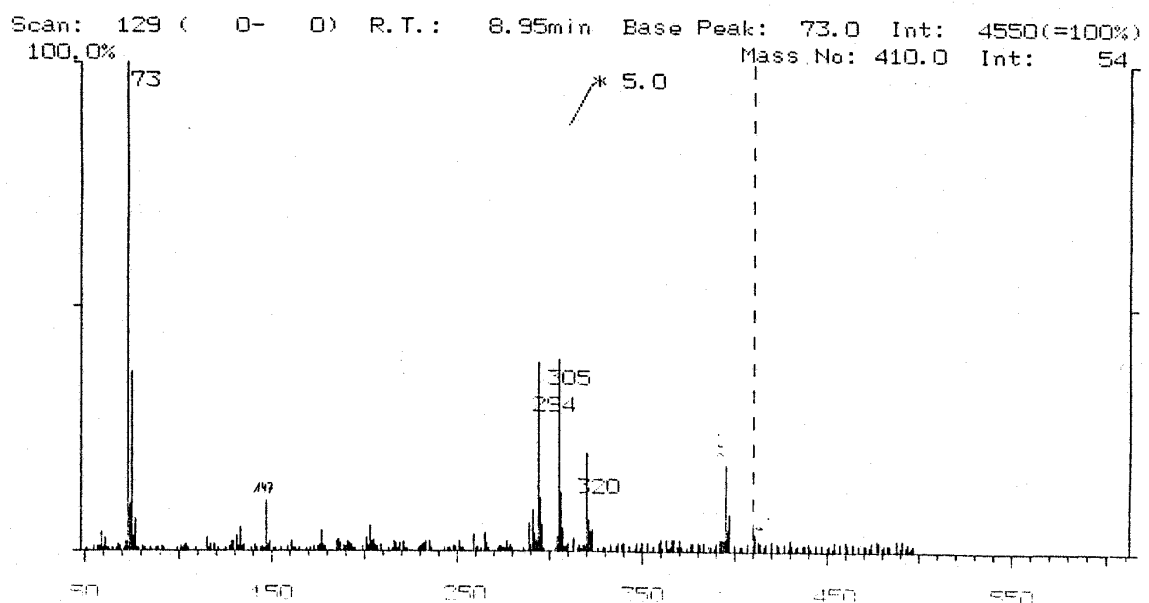


Abb. 20 Massenspektrogramm der GC/MS-Kopplung bei $t_R = 8.95$ (Probe mit BSTFA derivatisiert, TLC-getrennt) aus *Mf*-Rohextrakten

Durch die Anwendung von MS und deren Kopplung mit GC konnte die Identifizierung der Substanzen, die hinsichtlich ihres HPLC-Retentionsverhaltens sowie ihrer UV-spektralen Kennwerte mit den Angaben in der Literatur übereinstimmten, bestätigt werden. Darüber hinaus haben die ermittelten Massenspektren das Vorhandensein von methodenbedingten Fragmenten sowie von Nebenprodukten unbestimmter Art und Menge erwiesen, die bei der Interpretation zu berücksichtigen sind.

4.2.2.3 Gehalte an Pentaketid-Metaboliten von *Mf* unter *in vitro*-Bedingungen

Zur Charakterisierung der verschiedenen *Mf*-Isolate mit erwiesener Pathogenität gegenüber anfälligen Sorten von *Musa sp* wurden diese in flüssigem M-1D-Nährmedium ohne weitere Luftzufuhr inkubiert und ihr Endgehalt an 2,4,8-THT bestimmt. Die einer Behandlung zugeordneten Wiederholungen ($n = 3$) wurden zur Extraktion, Probenaufbereitung und Analyse der pilzlichen Substanzen zusammengefaßt und mehrmals HPL-chromatographisch quantifiziert, wobei die chromatographische Abweichung vom Mittelwert jeweils $< 5 \%$ verblieb. Der ermittelte Gehalt an ausgewählten Sekundärmetaboliten wurde auf die Trockenmasse des Pilzes bzw. auf das Inkubationsvolumen der Nährlösung auf molarer Basis bezogen:

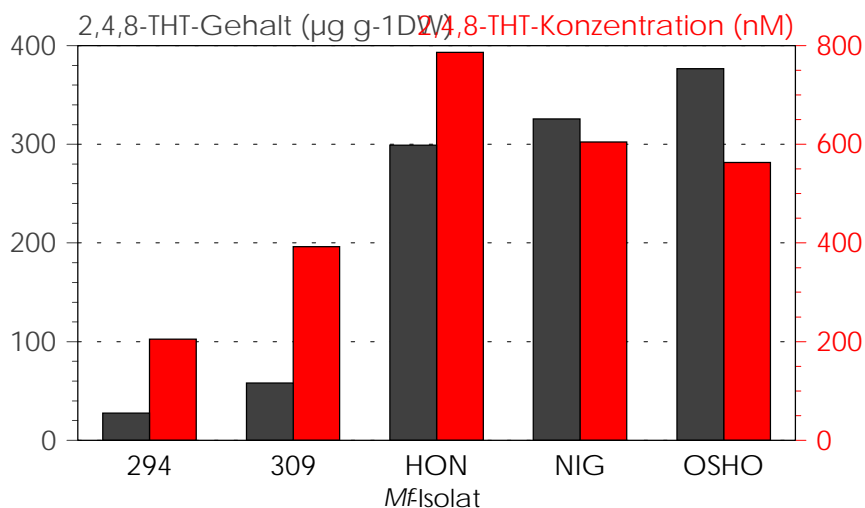


Abb. 21 2,4,8-THT-Gehalt ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) und -Konzentration (nM) in Kulturfiltraten verschiedener *Mf*-Isolate nach 45 Tagen Inkubationsdauer mit M-1D-Nährlösung

In allen geprüften *Mf*-Isolaten wurde 2,4,8-THT nachgewiesen, wobei unterschiedliche Konzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 45 Tagen bei den *Mf*-Isolaten 294 und HON zwischen 205 und 786 nM ermittelt wurden. In Abhängigkeit von dem Zuwachs an Myzelmasse, die bei den Isolaten 294 und 309 deutlich erhöht war, wurden 2,4,8-THT-Gehalte zwischen 25 (*Mf*-294) und 375 (*Mf*-OSHO) $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nachgewiesen.

Um die Dynamik der *in vitro*-Synthese von 2,4,8-THT zu untersuchen, wurden Nährsuspensionen des *Mf*-Isolates NIG inkubiert und die Konzentrationen weiterer Metabolite des Pentaketid-Biosyntheseweges (Flaviolin, 2-HJ und Juglon) nach unterschiedlicher Inkubationsdauer bestimmt (siehe Abbildung 23).

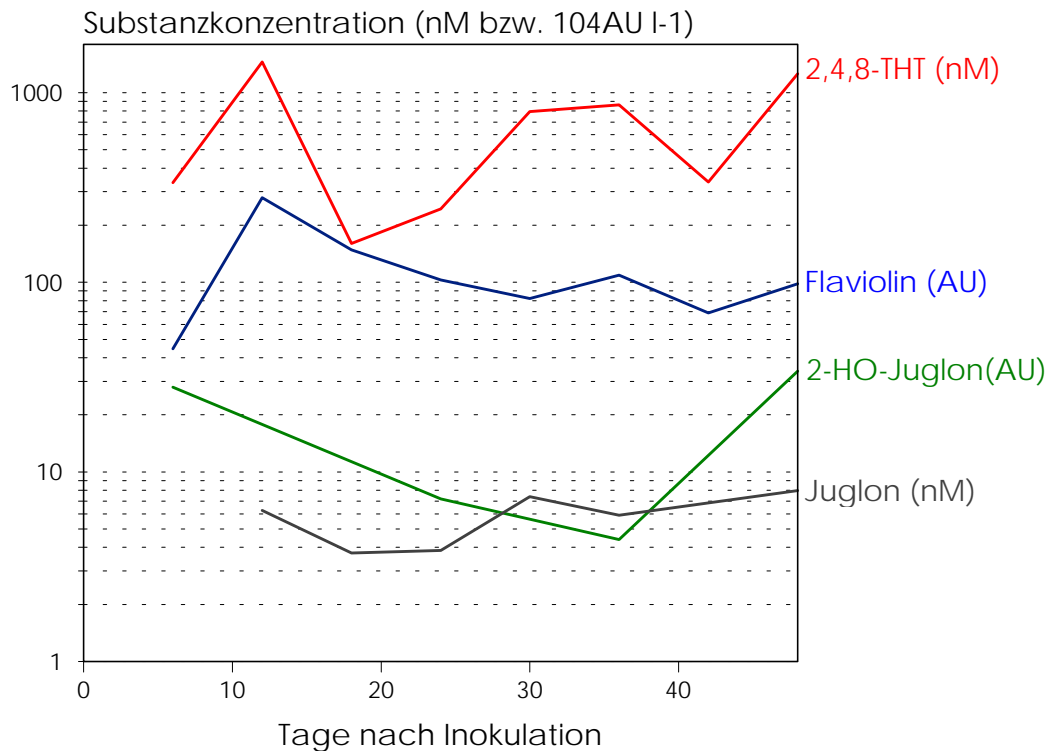


Abb. 22 Konzentrationen verschiedener Pentaketid-Metaboliten in Kulturfiltraten von *Mf*-NIG im Verlauf der Inkubationsdauer in M-1D-Nährlösung

2,4,8-THT war innerhalb von sechs Tagen nach Inokulation nachweisbar und erreichte schon nach zwölf Tagen Inkubationsdauer ein Maximum von 1050 pM. Flaviolin als Zwischenprodukt des Pentaketidmetabolismus zeigte die gleiche Dynamik von hohem Anfangsgehalt und leichtem Absinken auf wechselnde Werte im Verlaufe der Inkubation. Die beiden Zwischenprodukte 2-Hydroxyjuglon (2-HJ) und Juglon wurden im gesamten Untersuchungszeitraum nur in sehr geringen Mengen (Juglon < 8 nM) nachgewiesen. Die Inkubation in verschiedenen Kulturgefäßen mit unterschiedlicher Durchmischung und erhöhter Luftzufuhr hatte keine feststellbare Wirkung auf die Gehalte an untersuchten Metaboliten.

Zur Steigerung des Gehaltes an 2,4,8-THT in *Mf*-Nährsuspensionen wurde der Wirkstoff Tricyclazol® in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die 2,4,8-THT-Konzentrationen der Kulturfiltrate verschiedener *Mf*-Isolate unter Zugabe von 53.2 µM wurden in Beziehung gesetzt zu den Ergebnissen ohne Einsatz des Wirkstoffes (siehe Abbildung 24):

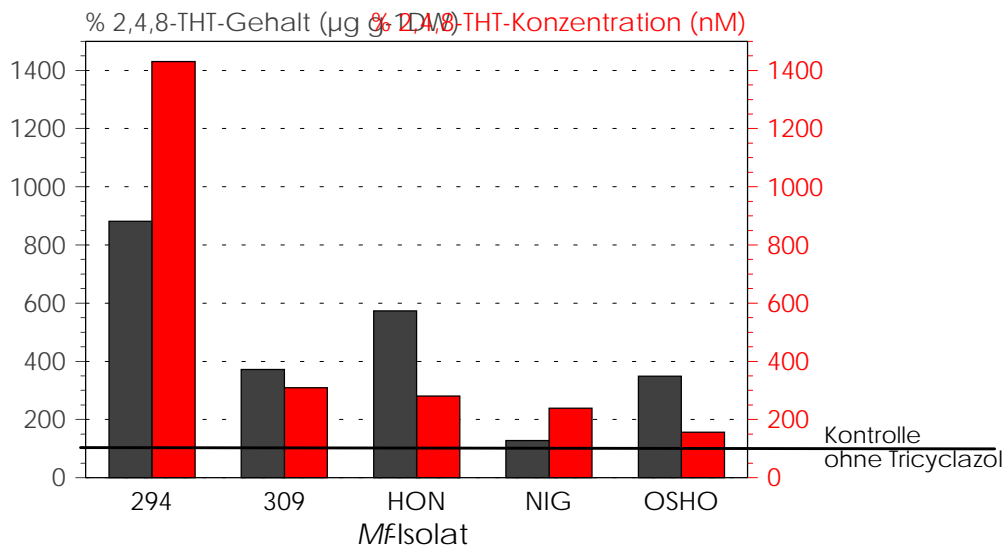


Abb. 23 Prozentuale Gehalte ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$) und Konzentrationen (nM) an 2,4,8-THT in Nährlösungen verschiedener *Mf*-Isolate bei Anwendung von $53.2 \mu\text{M}$ Tricyclazol nach 45 Tagen Inkubationsdauer in M-1D-Nährlösung, relativ zur unbehandelten Kontrolle

Alle *Mf*-Isolate reagierten auf die Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol[®] mit einer Erhöhung der 2,4,8-THT-Konzentration im Kulturfiltrat und des Gehaltes bezogen auf die Trockenmasse. Bei Isolat 294 stieg die Konzentration um den Faktor 14, wohingegen in den anderen Isolaten eine Verdoppelung bis Verdreifachung ermittelt wurde. Das Ausmaß der gesteigerten 2,4,8-Konzentration bei *Mf*-294 war auch das Ergebnis der nur geringen Konzentration des Metaboliten in Kulturfiltraten ohne den Wirkstoff (siehe Abbildung 22).

In Abhängigkeit von der Tricyclazol[®]-Konzentration wiesen die Gehalte an Pentaketid-Metaboliten den in Abbildung 25 dargestellten Verlauf auf. Die Konzentrationen von 2,4,8-THT und Flaviolin in der Nährlösung stiegen mit zunehmender Tricyclazol[®]-Dosis bis $1000 \mu\text{M}$ an, bei weiterer Erhöhung auf $2000 \mu\text{M}$ war keine weitere Steigerung der Konzentrationen an Pentaketid-Metaboliten zu erreichen. Die beiden Zwischenprodukte 2-HJ und Juglon zeigten keine Veränderung bei den untersuchten Wirkstoffkonzentrationen und verblieben auf dem ohne Tricyclazol[®]-Zugabe erreichten Niveau.

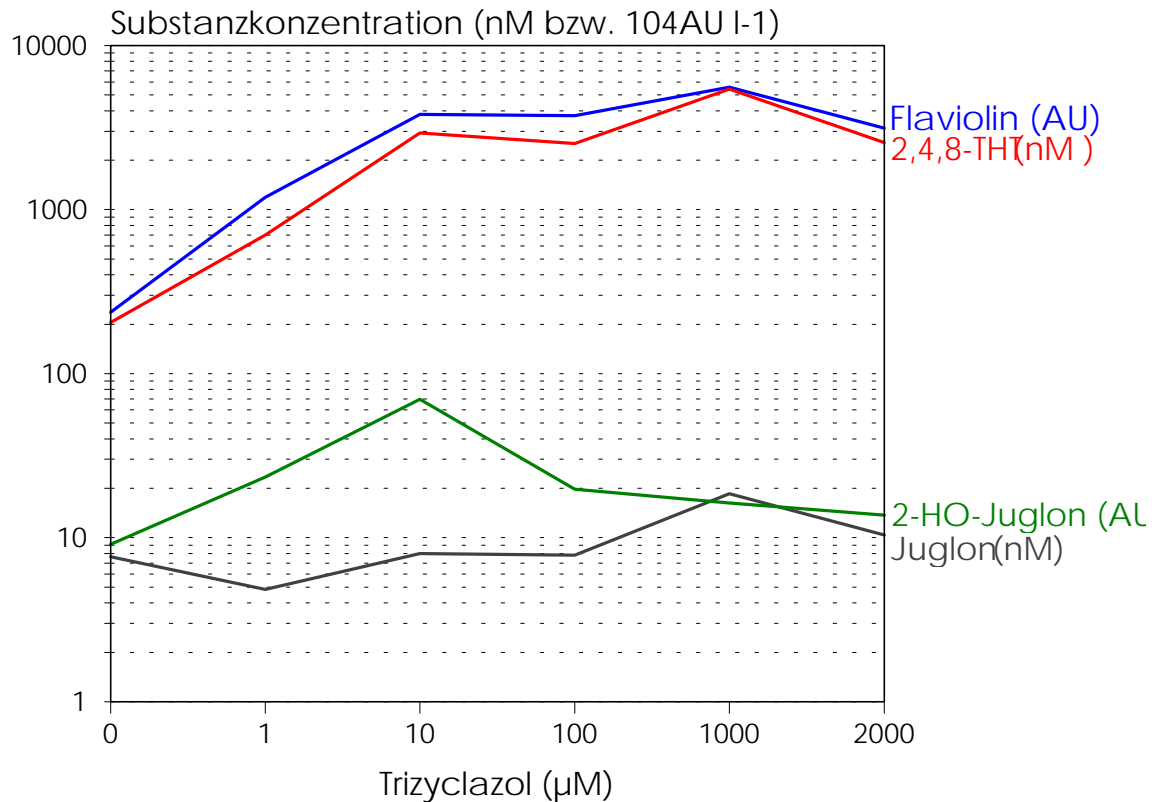


Abb. 24 Konzentrationen verschiedener Pentaketid-Metaboliten in Nährlösungen von *Mf*-294 bei verschiedenen Dosen des Wirkstoffes Tricyclazol® nach 45 Tagen Inkubationsdauer in M-1D-Nährlösung

Die Wirkung von Tricyclazol®-Behandlungen auf die Konzentrationen von 2,4,8-THT und Flaviolin ließ einen Zusammenhang zwischen beiden Metaboliten vermuten, der durch die lineare Regressionsgerade $y = 0.24 + 0.82 x$ beschrieben wird. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Gehalten betrug $r^2 = 0.894$ (siehe Abbildung 26).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in allen untersuchten *Mf*-Isolaten unter *in vitro*-Bedingungen der Pentaketidmetabolit 2,4,8-THT nachgewiesen werden konnte. Durch den Einsatz des Wirkstoffes Tricyclazol® war darüber hinaus eine bedeutende Steigerung der 2,4,8-THT-Konzentration festzustellen. Auch der Gehalt des Zwischenproduktes Flaviolin wurde durch den Wirkstoff gesteigert und legte einen engen Zusammenhang im Pentaketid-Biosyntheseweg zwischen beiden Metaboliten nahe. Die beiden Zwischenprodukte 2-HJ und Juglon waren nur in geringen Mengen nachweisbar und konnten durch Tricyclazol® in den untersuchten Konzentrationen nicht gesteigert werden.

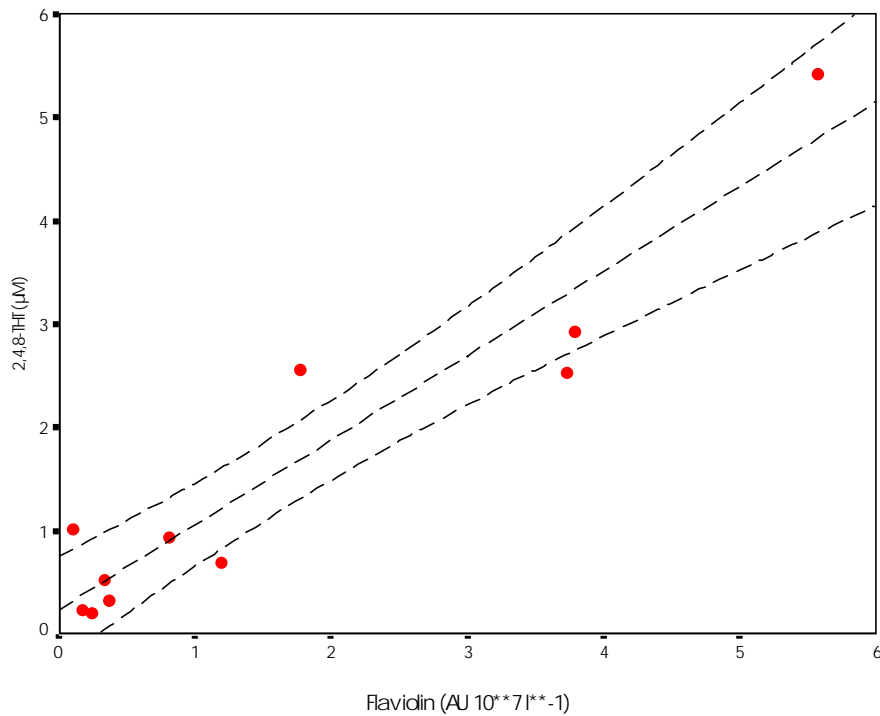


Abb. 25 Korrelation zwischen den Konzentrationen von Flaviolin und 2,4,8-THT in Kulturfiltraten von *Mf* (Mittelwert \pm Konfidenzintervall 95 %)

4.3 Interaktion *Musa cv* - *Mf*

4.3.1 Symptomentwicklung in *Musa cv*-Blattgewebe nach *Mf*-Inokulation

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen verschiedenen *Musa cv* und *Mf*-Isolaten unter den beschriebenen Bedingungen eines künstlichen Inokulationssystems wurde Myzelsuspension auf die Unterseite einer Blatthälfte aufgetragen und eine hohe Luftfeuchte sichergestellt. Die Bonitur der Krankheitssymptome erfolgte periodisch auf der Grundlage der von FULLERTON und OLSEN (1995) aufgestellten Stadien und orientierte sich an den jeweils am weitesten fortgeschrittenen Symptomen auf der inokulierten Blattspreite (Abbildung 27 und 28).

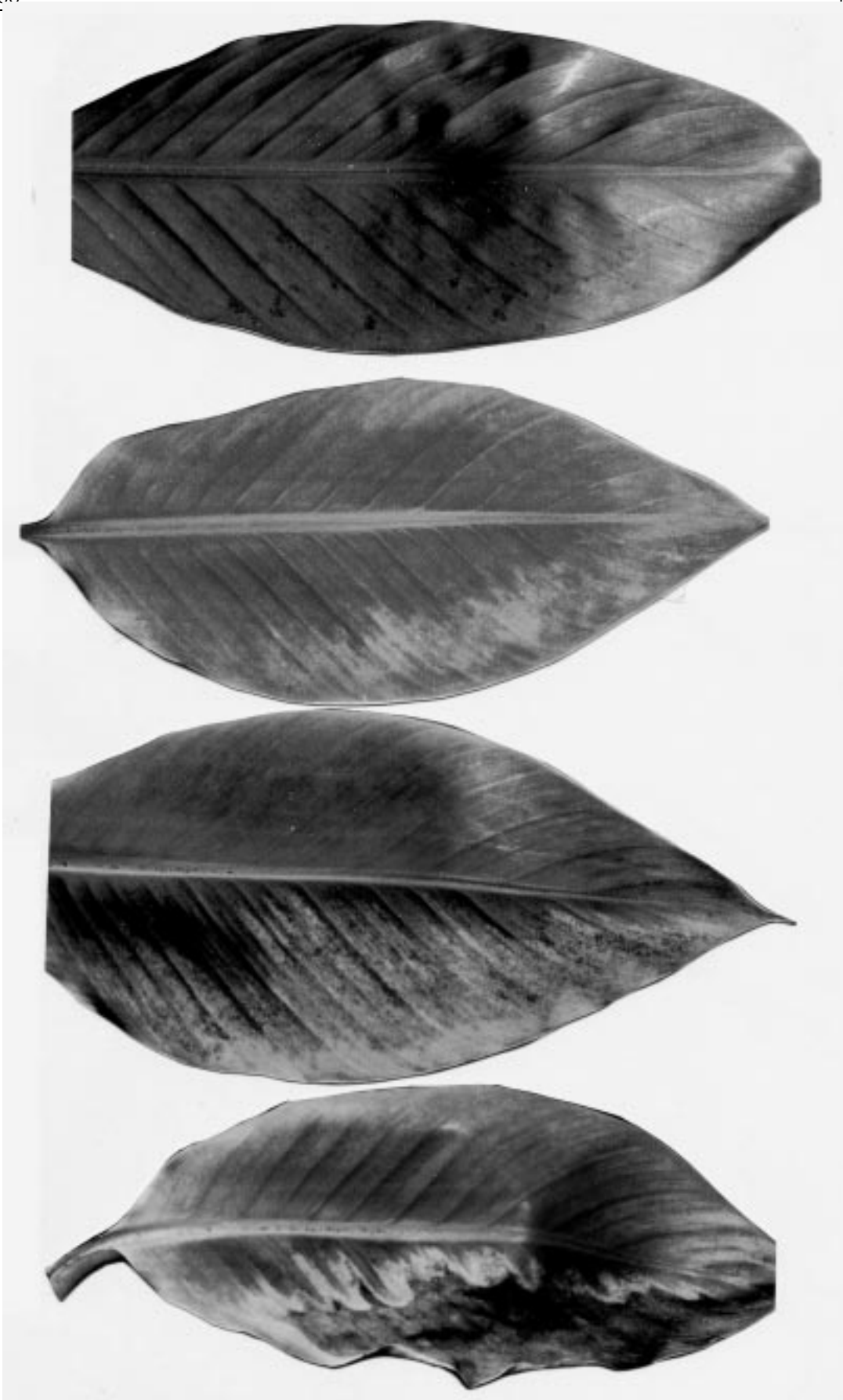


Abb. 26 Symptomausprägungen der Schwarzen Sigatokakrankheit auf inokulierten Blatthälften von *Musa* cv Yangambi km 5 (oben: 16 dpi, Stadium 1) und Dominico Hartón (zweite von oben: 25 dpi, Stadium 2; zweite von unten: 32 dpi, Stadium 3; unten: 40 dpi, Stadium 4); Stadien nach FULLERTON und OLSEN (1995)

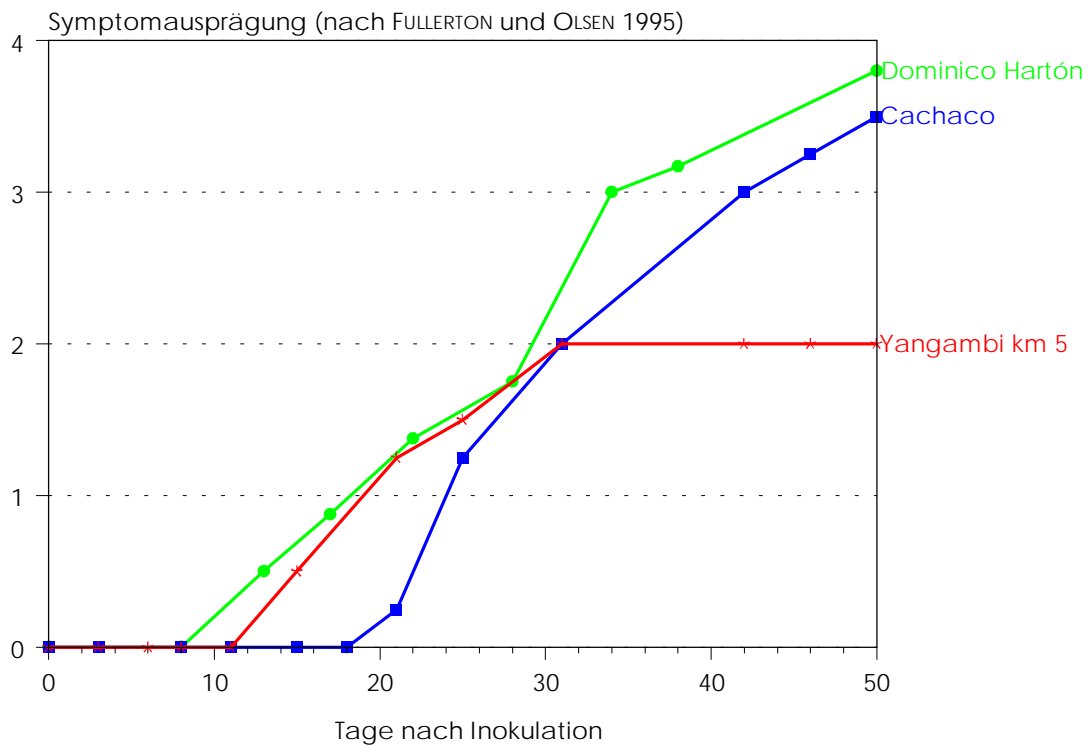


Abb. 27 Entwicklung der Krankheitssymptome auf verschiedenen *Musa* cv nach Inokulation mit Myzel des *Mf*-Isolates NIG unter Klimakammer-Bedingungen (Mittelwerte, n = 5)

Die empfindliche Sorte Dominico Hartón wies erste Symptome auf der Blattunterseite ab dem 12. Tag nach Inokulation (dpi) auf, die sich bis 32 dpi zu einer flächendeckenden Chlorose und beginnender Nekrotisierung auf Blattober- und Unterseite entwickelten. Das Absterben von Blattgewebe erfaßte bis 50 dpi fast die gesamte Blattspreite, war aber in diesem Stadium unter den gegebenen Bedingungen auch von der natürlichen Seneszens mitbeeinflusst. Die resistente Sorte Yangambi km 5 zeigte eine ähnliche Anfangsentwicklung bis etwa 28 dpi, wobei kleinräumige nekrotische Läsionen (Durchmesser < 3 mm) auftraten, die durch die Skalierung von FULLERTON und OLSEN (1995) jedoch nicht erfaßt wurden; danach verblieben die Flecke ohne weitere Ausdehnung. Bei der partiell resistenten Sorte Cachaco verlief die Pathogenese insgesamt langsamer als bei Dominico Hartón und führte erst nach 21 dpi zu ersten Symptomen; das chlorotische Stadium 3 wurde erst nach 45 dpi erreicht, die sich entwickelnden Nekrosen gingen in die altersbedingte Seneszens über.

Damit ist die unter Feldbedingungen ermittelte Reaktion der untersuchten *Musa* cv gegenüber dem Erreger *Mf* auch unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer und unter Verwendung von Myzel als Inokulumquelle reproduzierbar. Die Klassifizierung der drei verwendeten Sorten in die Phänotypen S (anfällig), PR (teilweise resistent) und HR (hochgradig resistent, Hypersensitivitätsreaktion) bildete die Grundlage für die weitere experimentelle Untersuchung der Wirtsreaktionen.

Die Symptomausprägung bei Inokulation mit den *Mf*-Isolaten CAM, OSHO, 294 und 309 wies keine signifikanten Unterschiede zum dargestellten Krankheitsverlauf bei *Mf*-NIG auf. Ausgewählte Isolate wurden während der gesamten Untersuchungsperiode in Abständen auf ihre Pathogenität und Virulenz gegenüber *Musa sp* überprüft, ohne eine Veränderung des pilzlichen und pflanzlichen Materials unter *in vitro*-Bedingungen festzustellen.

Bei der Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol® auf *Mf*-inokulierte *Musa cv* unter *in vivo*-Bedingungen in der praxisüblichen Konzentration von 4.0 mM traten folgende Symptome auf:



a. *Musa cv* Cachaco + *Mf* + Tricyclazol®



b. *Musa cv* Cachaco + *Mf* ohne Tricyclazol®

Abb. 28 Symptomausprägung auf *Musa cv* Cachaco 8 dpi mit *Mf*-Myzel: a. Anwendung von 4.0 mM Tricyclazol® auf inokulierte Blatthälfte; b. Kontrolle (inokuliert ohne Tricyclazol)

Bei allen drei mit *Mf*-Myzel inokulierten *Musa cv* führte die Anwendung von Tricyclazol unter *in vivo*-Bedingungen zu einer Nekrotisierung weiter Teile der Blattspreite innerhalb von 8 dpi (Abbildung 30). Die Symptome beschränkten sich dabei nicht nur auf die behandelte Blattspreite, sondern waren auch auf der gegenüberliegenden Seite der Mittelrippe deutlich ausgeprägt. Auf dem rasch abgestorbenen Blattgewebe kam es zu keiner Entwicklung des

Pilzes, so daß es trotz der nekrotischen Symptome in allen drei Bananensorten nicht zur Pathogenese kam.

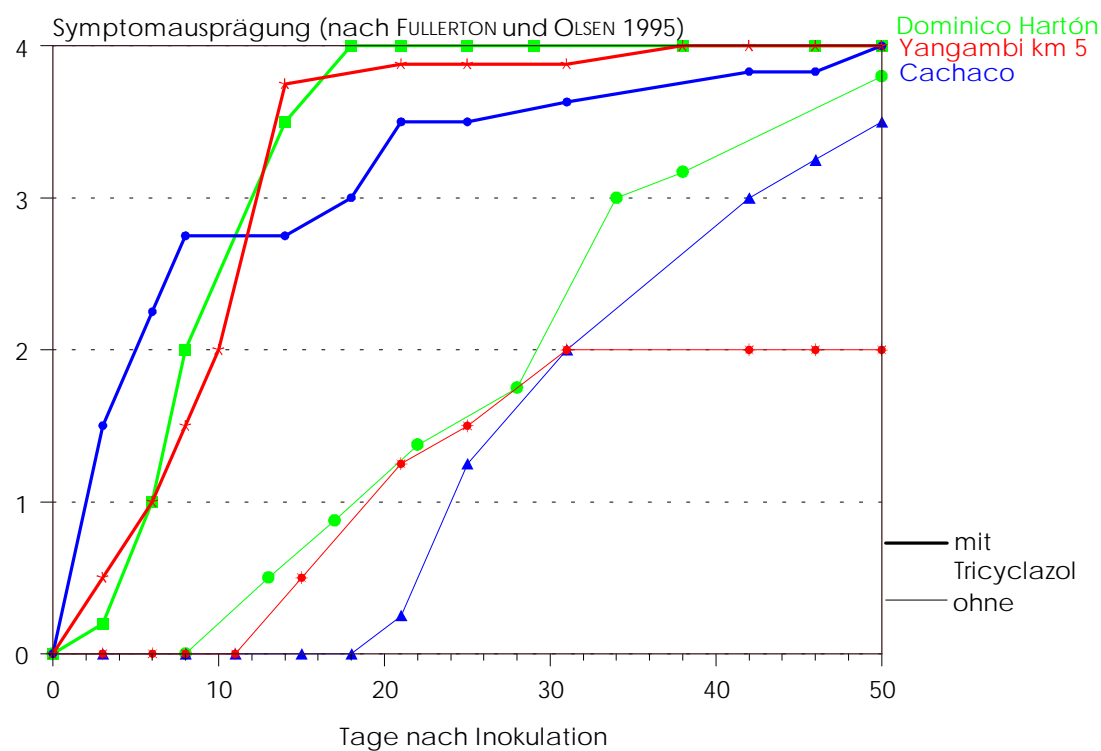


Abb. 29 Entwicklung der Krankheitssymptome auf verschiedenen *Musa* cv nach Inokulation mit Myzel des *Mf*-Isolates NIG unter Klimakammer-Bedingungen (Mittelwerte, n = 4) bei Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol® (4.0 mM, im Vergleich inokulierte Kontrolle ohne Wirkstoff)

4.3.2 Mikroskopische Untersuchungen infizierter *Musa*-Kalli

Zur histologischen Charakterisierung des Kontaktraumes zwischen pilzlichem Myzel und pflanzlichem Gewebe wurden Kalli der Sorten Yangambi km 5 und Cachaco oberflächlich inokuliert (*Mf*-Isolat NIG) und gemeinsam inkubiert. Dabei zeigte das Myzel auf Cachaco ein deutliches Wachstum auf der Oberfläche des Kallus und bildete weitreichende Hyphen in den tieferliegenden Bereichen. Das *Mf*-Inokulum auf Yangambi km 5 dagegen wuchs nur sehr langsam und verblieb als oberflächlich aufliegendes Polster auf dem Kallus.

Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Kalli zeigten den engen räumlichen Kontakt zwischen den Pilzhypen und den pflanzlichen Zellen: Die intakten Zellwände von beiden Organismen lagen dabei sehr dicht beieinander, ohne sich jedoch gegenseitig erkennbar zu beeinträchtigen (Abbildung 32): Im Falle der Sorte Cachaco nahm die Nekrotisierung des Kallus, ausgehend von der Inokulationsstelle des Myzels, langsam zu, wobei die Pilzhypen auch in Bereichen abgestorbener Wirtszellen ihre Funktionsfähigkeit erhielten (Abbildung 32 a, b: Zellkern, Mitochondrien, Glycogen und Lipide sichtbar). Bei Yangambi km 5 bildeten die nekrotischen Zellen unterhalb des Pilzmyzels nur eine schmale Schicht, unterhalb der nur noch wenige kollabierte Hyphenzellen nachweisbar waren (Abbildung 32 c, d).

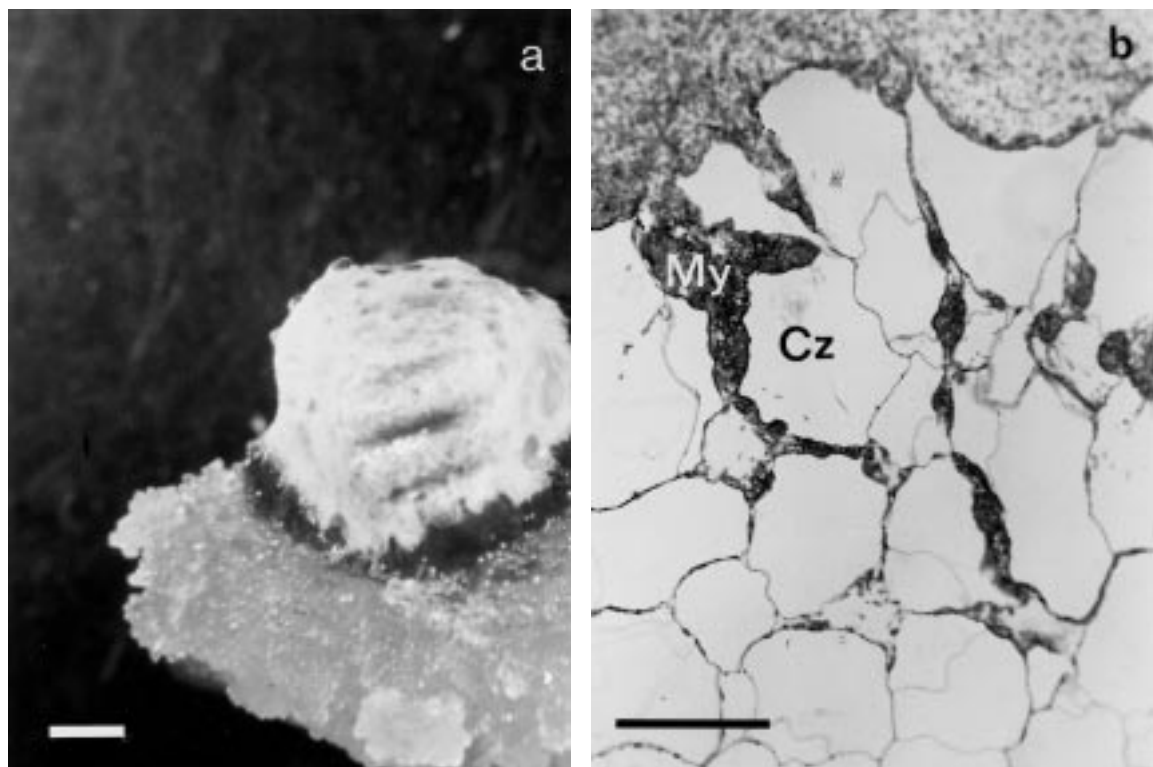


Abb. 30 *Mf*-inokulierter Kallus von *Musa* cv Cachaco nach 3 Wochen Inkubationszeit:

a. Gesamtansicht (Vergr. 10x, Balkenlänge = 1 mm);

b. Semidünnschnitt des Kontaktbereiches Kallus/*Mf* (Vergr. 200x, Balkenlänge = 100 µm)

Die Untersuchungen konnten an Kalli der Sorte Dominico Hartón nicht durchgeführt werden, da deren umfangreiche Verbräunung nach kurzer Inkubationszeit auch ohne Inokulation mit *Mf* keine hinreichende Voraussetzung zur Nutzung als Substrat für das Pilzmyzel bot.

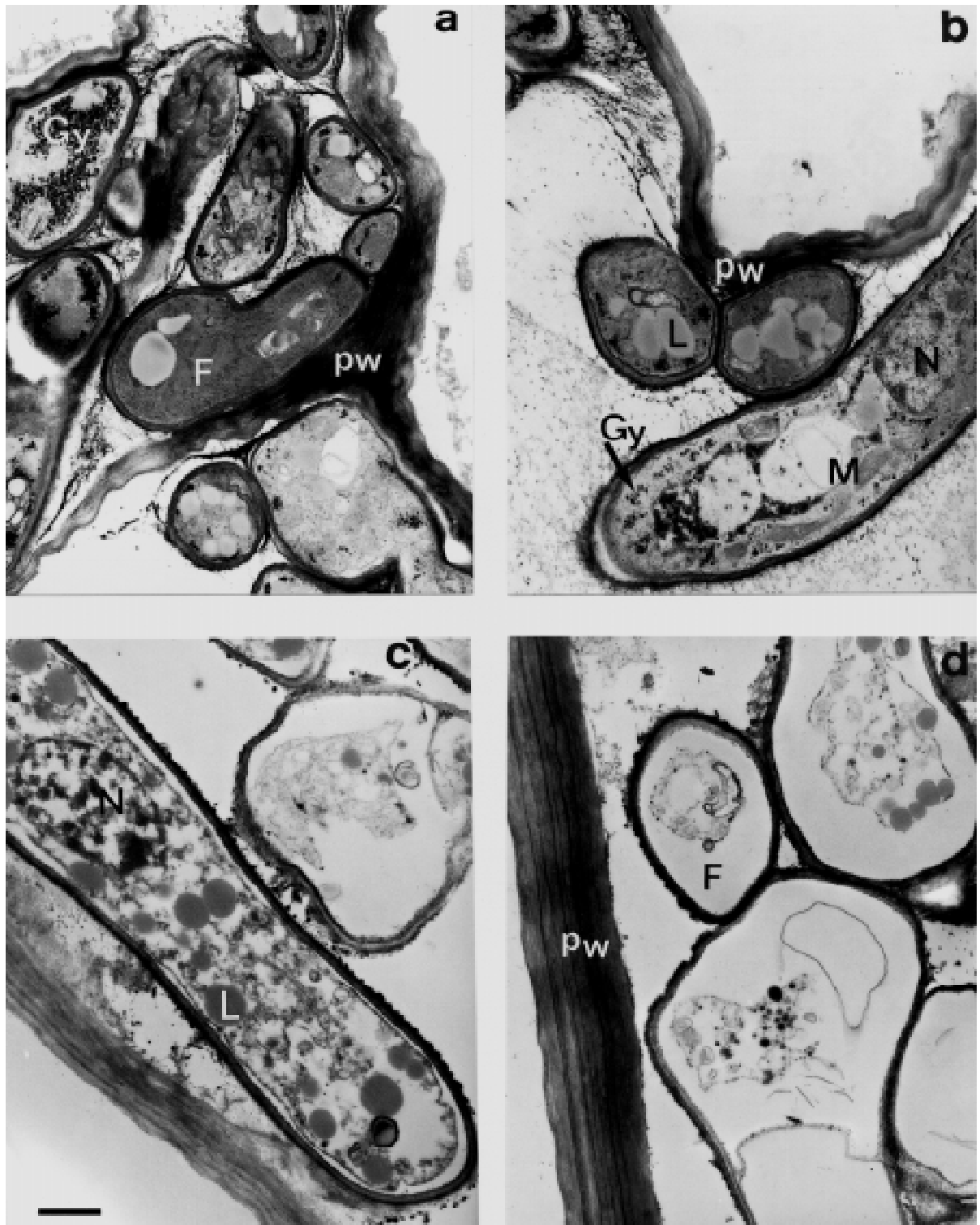


Abb. 31 TEM *Mf*-inokulierter Kalli von *Musa* cv Cachaco (a, b) und Yangambi km 5 (c, d)
(Cz Kalluszelle; F Pilzhyphe; Gy Glykogen; L Lipid; M Mitochondrien; My Pilzmyzel; N Nukleus;
PW pflanzliche Zellwand; Vergr. 13'000x, Balkenlänge 1 µm)

4.3.3 Einfluß von *Mf*-Extrakten und -Metaboliten auf *Musa cv*

Um den Einfluß ausgewählter Sekundärstoffe des pilzlichen Metabolismus auf verschiedene *Musa cv* und deren Funktion und Spezifität innerhalb der Pathogenese zu untersuchen, wurden die pflanzlichen Gewebe mit verschiedenen *Mf*-Extrakten sowie deren Fraktionen nach Auftrennung durch SPE und HPLC behandelt. Jede Behandlung erfolgte unter Anwendung der „leaf-puncture-wound overlay technique“ auf dem jüngsten Blatt von 4 Bananenpflanzen in jeweils dreifacher Wiederholung; der Durchmesser der entstehenden nekrotischen Flecke wurde nach 48 Stunden vermessen.

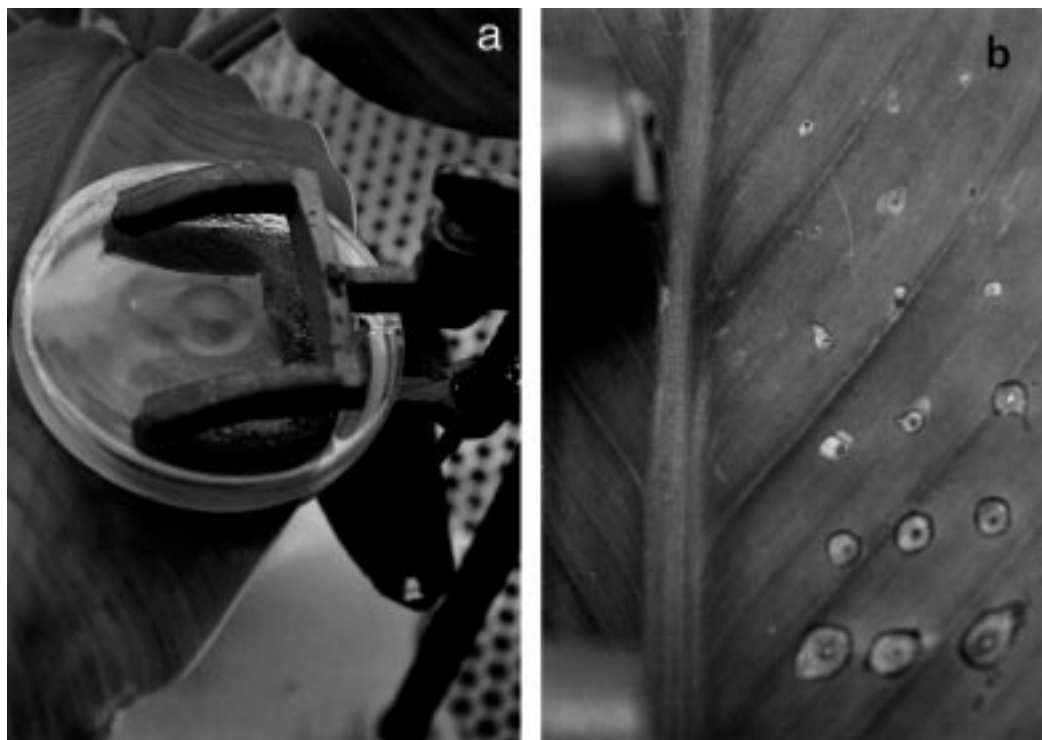


Abb. 32 Anwendung der „leaf-puncture-wound overlay technique“ (STIERLE et al 1991, 1992) auf *Musa sp.*: a. Feuchte Kammer zur Inkubation; b. nekrotische Flecken durch Juglon in verschiedenen Konzentrationen auf *Musa cv* Dominico Hartón (K = Kontrolle, n = 3)

Zunächst wurden die aus den Kulturfiltraten von *Mf* gewonnenen Rohextrakte ohne weitere Fraktionierung verwendet; der Gehalt an 2,4,8-THT im Rohextrakt entsprach ungefähr 5 mM, Juglon war mit HPLC nicht nachweisbar (Abbildung 34).

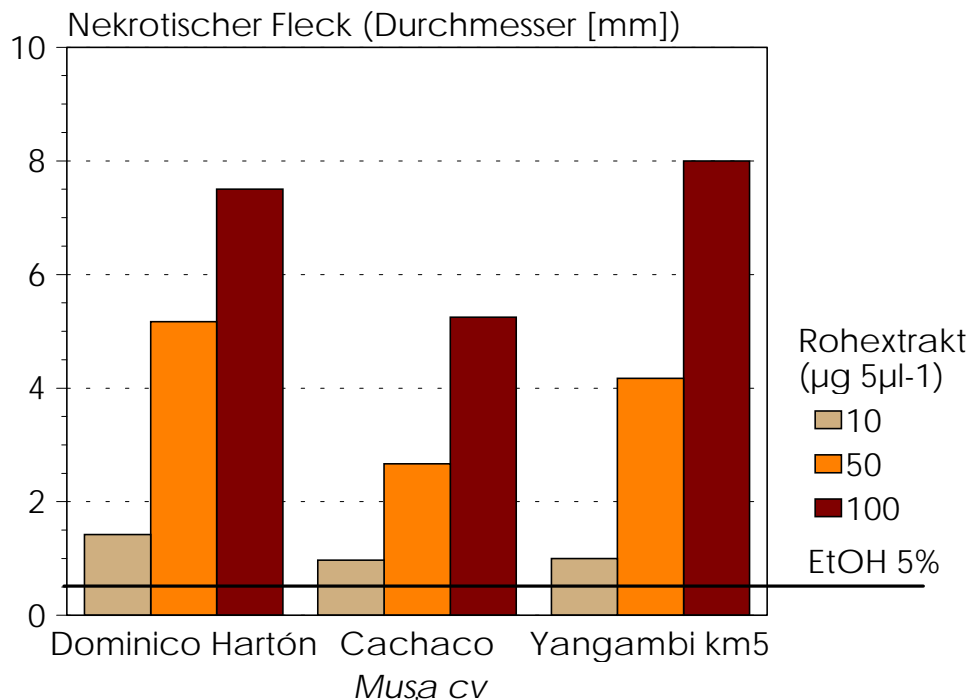


Abb. 33 Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener *Musa cv* 48 Stunden nach Anwendung von *Mf*-Rohextrakten mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“

Die durch die ethanolische Lösung (5 % v/v) und die mechanische Beanspruchung bedingte Verletzung verblieb bei allen Sorten unter 0.5 mm pro „puncture“. Die angewendeten Rohextrakt-Konzentrationen zeigten eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung in allen drei *Musa cv*, allerdings wies die PR-Sorte Cachaco eine im Vergleich zu beiden anderen Sorten leicht geringere Sensitivität auf. Die Größe der nekrotischen Flecken einerseits und der HPL-chromatographisch ermittelte Gehalt an 2,4,8-THT andererseits waren Hinweise für das Vorhandensein weiterer Nekrose-induzierender Substanzen in den Rohextrakten.

Zur Untersuchung der Spezifität weiterer *Mf*-Substanzen gegenüber *Musa cv* wurde die in der SPE-Probenvorbereitung gewonnene Fraktion der Spülung mit Hexan, die die apolaren Bestandteile des Rohextraktes enthielt, ebenfalls auf die Blätter der drei Sorten appliziert; im Extrakt waren keine Pentaketid-Metaboliten aus *Mf* nachweisbar (Abbildung 35).

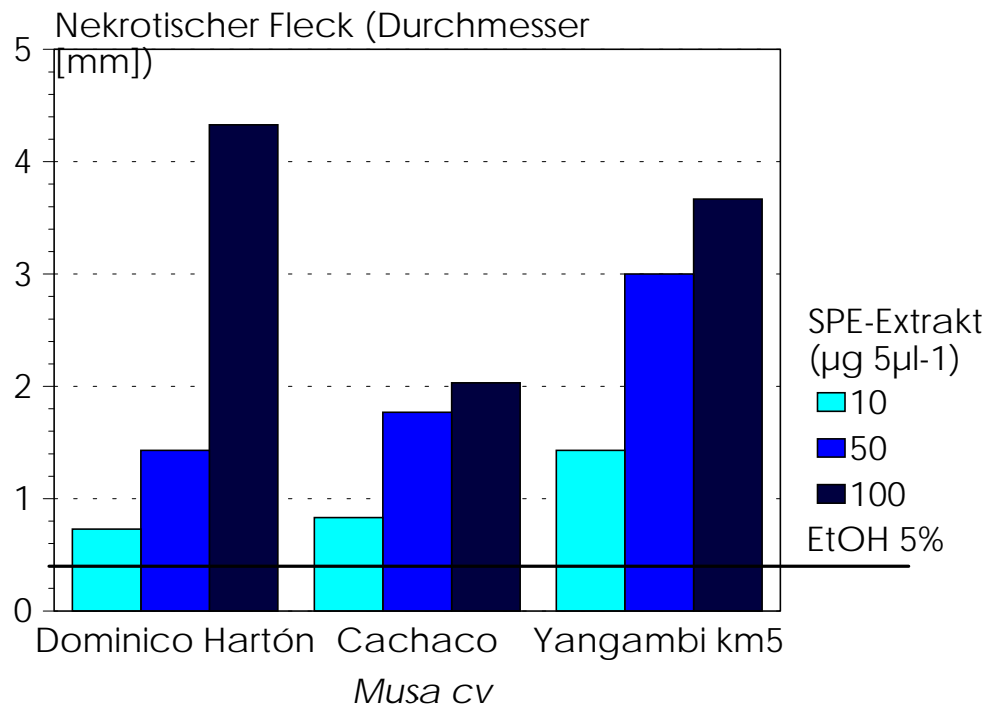


Abb. 34 Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener *Musa cv* 48 Stunden nach Anwendung von *Mf*-Extrakten aus der SPE-Spülung (Hexan) mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“

Die Wirkung der durch Hexanspülung gewonnenen Extrakte war bei gleichen Konzentrationen wie die der Rohextrakte durch ein deutlich geringeres Ausmaß an Nekrosen gekennzeichnet. Die Sorten Dominico Hartón und Yangambi km 5 wiesen in der angewendeten Höchstdosis von 100 µg 5 µl⁻¹ höhere Sensitivitäten gegenüber dem applizierten Extrakt auf als Cachaco.

Zur Untersuchung ausgewählter *Mf*-Sekundärmetaboliten wurden die in der SPE-Aufreinigung durch Elution mit Methanol gewonnenen Extrakte durch HPLC fraktioniert und die beiden Substanzen 2,4,8-THT und Juglon getrennt appliziert. 2,4,8-THT wies einen Reinheitsgrad von 88 bis 96 % (w/v) auf (Detektion bei $\lambda = 254$ nm), bei Juglon werden vom Hersteller „approx. 95 %“ angegeben. Aus den Ergebnissen der Anwendung von 2,4,8-THT in verschiedenen Konzentrationen auf die drei *Musa cv* (Abbildung 36) ließen sich sortenspezifische Dosis-Wirkungsbeziehungen ableiten, die in Abbildung 37 und Tabelle 12 dargestellt sind.

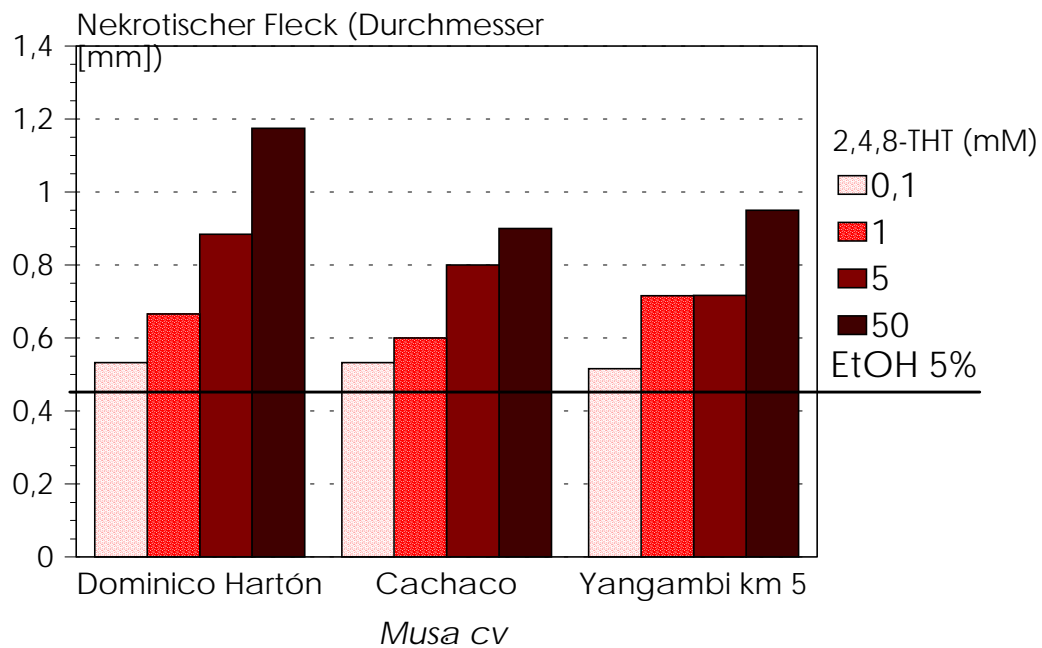


Abb. 35 Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener *Musa cv* 48 Stunden nach Anwendung von 2,4,8-THT aus *Mf*-Rohextrakten mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“ (Applikationsmenge jeweils 5 μ l)

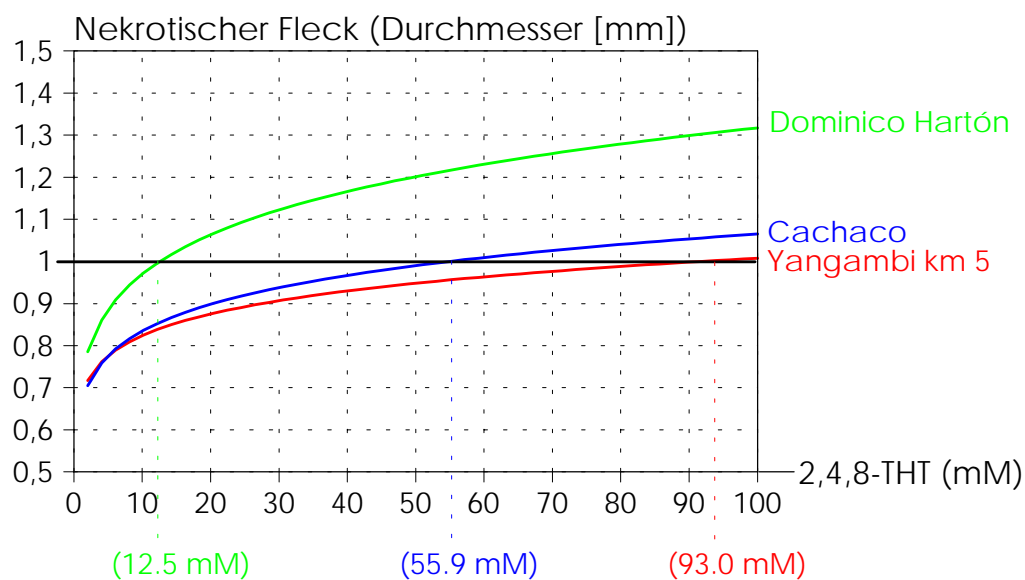


Abb. 36 Dosis-Wirkungsbeziehungen von 2,4,8-THT auf verschiedene *Musa cv* und sortenspezifische Konzentrationen zur Erzeugung eines nekrotischen Fleckes von 1.0 mm Durchmesser

Die nekrotische Wirkung des 2,4,8-THT bei Anwendung der „leaf-puncture technique“ auf Blattgewebe war ab einer Konzentration von 0.1 mM (Tropfenvolumen 5 µl) nachweisbar. Die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung war bei der anfälligen Sorte Dominico Hartón stärker ausgeprägt als bei der HR- bzw. PR-Sorte Yangambi km 5 und Cachaco. Die folgende Tabelle faßt die Parameter der potenzierten Regressionsgleichung sowie die sortenspezifischen Selektivitätsindizes (Wirkung von Substanzen auf anfällige vs resistente Pflanzengewebe, WHEELER 1981) für die Anwendung von 2,4,8-THT auf die drei *Musa cv* zusammen:

Tab. 12 Statistische Kennwerte der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen 2,4,8-THT und Blattnekrosen auf den verschiedenen *Musa cv*

<i>Musa cv</i>	Konstante (a)	Steigungs- faktor (b)	Korrelations- koeffizient (r ²)	Standard- abweichung (SD)	Selektivitäts- Index (WHEELER 1981)
Dominico Hartón	-0.337	0.133	0.682	0.224	-
Cachaco	-0.425	0.106	0.366	0.171	4.47
Yangambi km 5	-0.359	0.087	0.667	0.133	7.44

Potenzierte Regression: $\ln(y) = a + b \ln(x)$, mit $x = 2,4,8\text{-THT (mM)}$, $y = \text{Blattnekrose (Durchmesser[mm])}$

Ein Vergleich des Steigungsfaktors (b-Wert) zeigte einen geringeren Anstieg der Dosis-Wirkungsbeziehung bei zunehmenden Konzentrationen des *Mf*-Metaboliten 2,4,8-THT in der Reihenfolge Dominico Hartón, Cachaco und Yangambi km 5, der auf eine abnehmende Sensitivität resistenter *Musa cv* gegenüber hohen Konzentrationen hinwies. Beispielhaft ist die Dosis zur Erzeugung einer Nekrose von 1.0 mm Durchmesser extrapoliert: Dominico Hartón (12.5 mM) vs Cachaco (55.9 mM) vs Yangambi km 5 (93.0 mM). Die Selektivitätsindizes von Dominico Hartón gegenüber der PR- bzw. HR-Sorte entsprachen 4.47 bzw. 7.44.

Die Applikation von Juglon (siehe Abbildung 38) führte ab 0.5 mM zu deutlichen nekrotischen Wirkungen. Ebenso wie im Falle des 2,4,8-THT weist die Sorte Yangambi km 5 im Vergleich zu Dominico Hartón und Cachaco eine geringere Steigung der Dosis-Wirkungsbeziehung auf, der bei einer Konzentration von 500 mM am stärksten ausgeprägt war. Die Selektivitätsindizes verblieben aber deutlich unterhalb von 10.

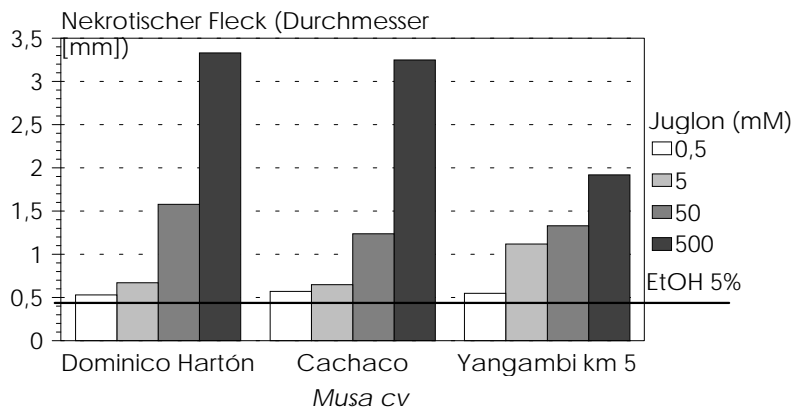


Abb. 37 Nekrotische Flecken auf Blattgewebe verschiedener *Musa cv* 48 Stunden nach Anwendung von Juglon mit der „leaf-puncture-wound overlay technique“ (Applikationsmenge jeweils 5 µl)

Beide Pentaketide aus *Mf* (2,4,8-THT und Juglon) verursachten bei gleicher Konzentration (auf molarer Basis) Blattflecken vergleichbarer Ausdehnung. Hinsichtlich der Wirtsspezifität gegenüber *Mf*-Metaboliten waren Unterschiede zwischen verschiedenen *Musa cv* feststellbar, wobei die resistente Sorte Yangambi km 5 eine geringere Sensitivität gegen 2,4,8-THT (Abbildung 36) und vor allem gegen Juglon (Abbildung 38) aufwies. Die geringere Empfindlichkeit von Yangambi km 5 gegenüber *Mf*-Metaboliten wurde bei höheren Konzentrationen der untersuchten Pentaketide besonders deutlich.

Um den Einfluß der Blattmorphologie der verschiedenen *Musa cv* auf die nekrotische Wirkung durch pilzliche Metaboliten zu vermindern, wurde die „leaf-disk infiltration technique“ nach LEPOIVRE und ACUNA (1990) angewendet (Abbildung 39). Die Leitfähigkeit der nach 24 Stunden Inkubation mit Blattstücken verschiedener *Musa cv* gemessenen Lösungen diente als Maß für die irreversible Schädigung der Zellen im Gewebe und zeigte die in Abbildung 40 dargestellten Ergebnisse.

Die Messung der Leitfähigkeit in Probelösungen bis zu der Höchstkonzentration von 28,8 M Juglon zeigte bei allen *Musa cv* Maximalwerte deutlich unterhalb der durch Kälteeinwirkung hervorgerufenen Zellzerstörungen. Dabei konnte bei Dosen über 288 mM keine wesentliche Erhöhung bzw. sogar eine leichte Verminderung der Leitfähigkeit ermittelt werden. Die Sensitivität der Sorte Yangambi km 5 war in allen angewendeten Dosen höher als die der beiden anderen *Musa cv*; Cachaco zeigte sich gegenüber hohen Juglonkonzentrationen vergleichsweise insensitiv, wohingegen die *Mf*-anfällige Dominico Hartón eine Zunahme der Leitfähigkeit bis zu der angewendeten Höchstdosis von Juglon aufwies.

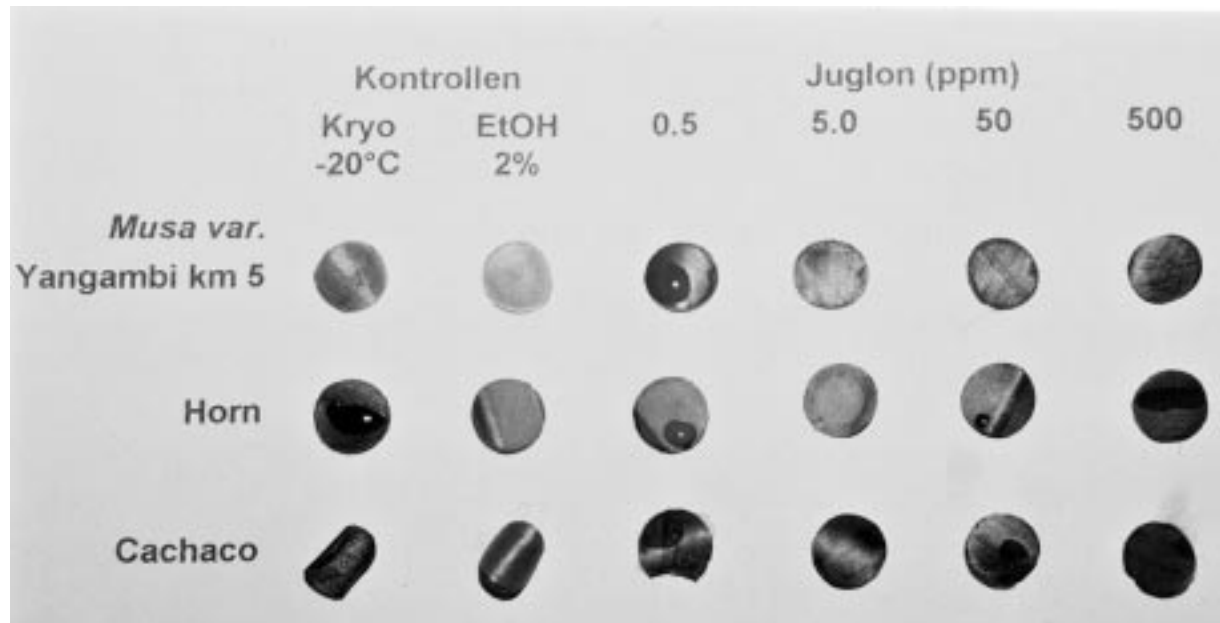


Abb. 38 Nekrose auf Blattstücken verschiedener *Musa* cv nach Einwirkung von Juglon unter Anwendung der „leaf-disk infiltration technique“ (LEPOIVRE und ACUNA 1990)

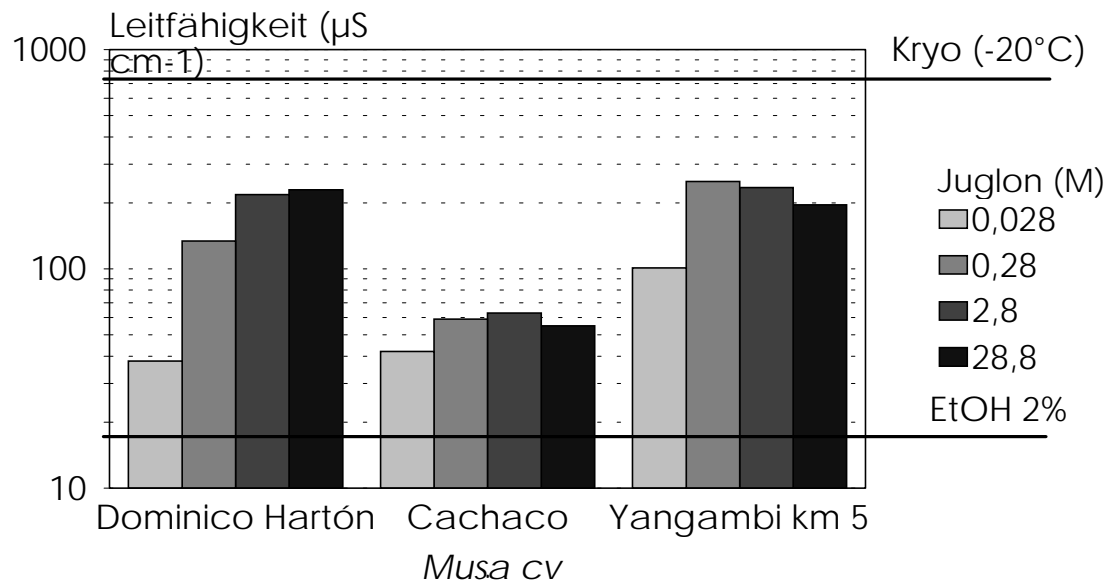


Abb. 39 Leitfähigkeit verschiedener *Musa* cv nach Vakuuminfiltration und Inkubation mit Juglon-Lösungen verschiedener Konzentrationen

Insgesamt belegten die Ergebnisse der Versuche unter Anwendung verschiedener Applikationstechniken mit isolierten *Mf*-Metaboliten die starke Abhängigkeit der Wirkungen auf Blattgewebe von der angewendeten Methode.

4.3.4 Einfluß von *Musa cv* auf *Mf*-Metaboliten

Zur Untersuchung der Wirkungen von Pflanzeninhaltsstoffen auf den Sekundärmetabolismus von *Mf* wurde der Interzellularraum des nichtinfizierten Blattgewebes verschiedener *Musa cv* durch Vakuuminfiltration extrahiert und die gewonnenen wässrigen Kulturfiltrate als Nährlösung für den Pilz angesetzt (vgl. Abschnitte 3.1.3 und 3.2.1). Damit wurde unter *in vitro*-Bedingungen ein System etabliert, das dem trophischen Verhältnis des Pilzes zum Zeitpunkt der Inokulation und beginnenden Infektion im Interzellularraum nahekommt und die Wirt-Pathogeninteraktionen in dieser ersten Phase des Zusammentreffens reflektiert; die gewählte *Mf*-Inkubationsdauer von 12 Tagen bildete die notwendige Zeitspanne zum Nachweis pilzlicher Metaboliten in der Nährlösung. Die durch den Pilz hervorgerufenen postinfektionellen Reaktionen der Pflanze konnten durch die Wahl der pflanzlichen Extrakte aus präinfektionellem Blattgewebe ausgeschlossen werden.

Die chromatographische Analyse der aus *Musa cv* gewonnenen und nach Inkubation mit *Mf* extrahierten Kulturfiltrate, die pflanzliche und pilzliche Substanzen enthielten, wurde durch die erhöhte Peakdichte und die dadurch verursachte fehlende Basislinientrennung beeinträchtigt. Der pilzliche Sekundärmetabolit 2,4,8-THT konnte aber mit hinreichender Sicherheit getrennt und quantifiziert werden; die in den untersuchten Behandlungen festgestellten Konzentrationen des *Mf*-Metaboliten 2,4,8-THT (siehe folgende Abbildung) ermöglichten eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse.

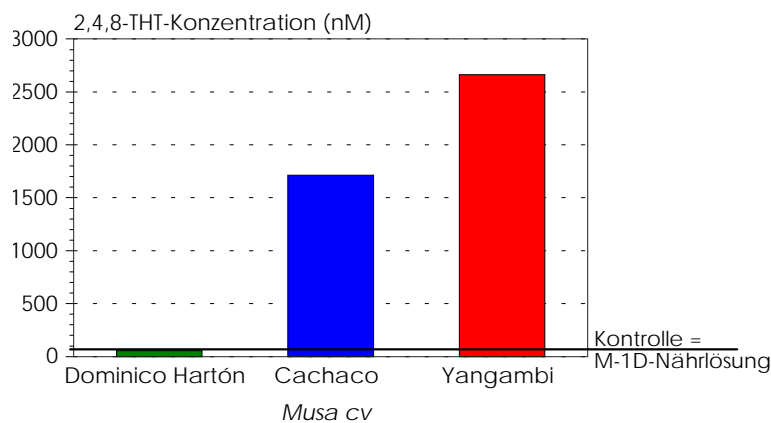


Abb. 40 Konzentration des Sekundärmetaboliten 2,4,8-THT im Kulturfiltrat von *Mf*-309 nach 12 Tagen Inkubation mit Blattextrakten verschiedener *Musa cv*

Das *Mf*-Kulturfiltrat, das auf der Basis von Blattextrakten von *Musa cv* Yangambi km 5 hergestellt wurde, wies mit 2660.9 nM die höchste Konzentration an 2,4,8-THT nach 12 Tagen Inkubationsdauer auf. In den Kulturfiltraten der Sorte Cachaco wurden Konzentrationen von

1713.6 nM und bei der anfälligen Dominico Hartón von 58.0 nM bestimmt. Im Vergleich dazu entsprach die 2,4,8-THT-Konzentration in der Kontrolle (M-1D-Nährlösung ohne Pflanzenextrakte) 29.38 nM. Die Konzentrationen anderer *Mf*-Metaboliten in den Behandlungen entsprach denjenigen der Kontrolle. Die ermittelten Myzel-trockenmassen in den verschiedenen Behandlungen am Ende der Inkubationsperiode entsprachen der Kontrolle und wiesen auch untereinander keine signifikanten Unterschiede auf.

Zur Untersuchung der weiteren Interaktionen zwischen *Musa cv* Yangambi km 5 und *Mf*-Metaboliten wurden die zu extrahierenden Blätter zuvor mit Kanamycin als Induktor von Abwehrmechanismen behandelt (siehe Abschnitt 3.1.3), so daß die mit dem Erreger inkubierten pflanzlichen Extrakte postinfektionell wirksame Stoffwechselprodukte enthielten:

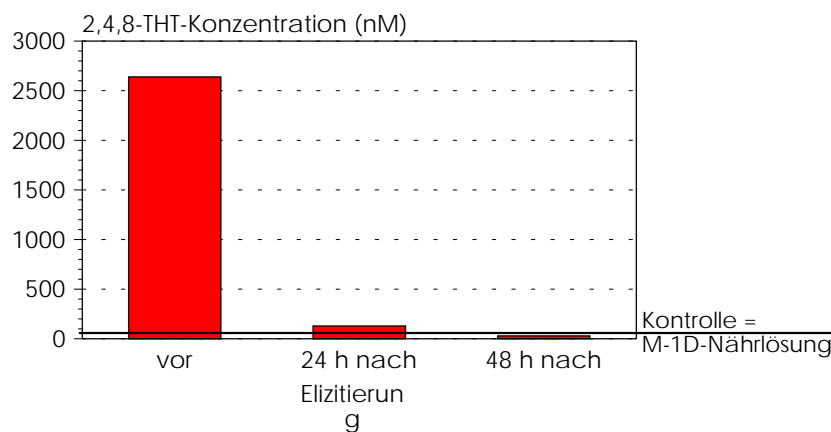


Abb. 41 Konzentration des Sekundärmetaboliten 2,4,8-THT im Kulturfiltrat von *Mf*-309 nach 12 Tagen Inkubation mit Blattextrakten vor und 24 bzw. 48 Stunden nach Behandlung von *Musa cv* Yangambi km 5 mit Kanamycin

Im Vergleich zu dem Gehalt an 2,4,8-THT in *Mf*-Nährlösungen, die aus *Musa cv* Yangambi km 5 vor Elizitierung gewonnen wurden, wiesen die Kulturfiltrate, die nach Behandlung mit Kanamycin (24 bzw. 48 Stunden nach Elizitierung) extrahiert und inkubiert wurden, deutlich geringere Gehalte des pilzlichen Metaboliten auf.

Die fördernde Beeinflussung des 2,4,8-THT-Stoffwechsels durch resistente *Musa cv* war nach den in Abbildung 42 dargestellten Ergebnissen also auf das Vorhandensein präinfektioneller Mechanismen zurückzuführen, deren Wirkung im Verlaufe der postinfektionellen Abwehrreaktion nachließ. 48 Stunden nach erfolgter Elizitierung gewonnene Extrakte aus *Musa cv* Yangambi km 5 bewirkten 2,4,8-THT-Konzentrationen in inkubierten *Mf*-Kulturfiltraten, die den aus der anfälligen Sorte Dominico Hartón gewonnenen Extrakten bzw. der Kontrolle ohne Zusatz von Blattextrakten entsprachen.

5 Diskussion

Ausgehend von dem in der Einleitung formulierten Begründungszusammenhang für die vorliegende Arbeit sollen im folgenden Kapitel zunächst die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen zur Charakterisierung des pflanzlichen (Abschnitt 5.1) sowie des pilzlichen (5.2) Sekundärmetabolismus diskutiert werden. Die Frage nach der Spezifität und Funktion des 2,4,8-THT im Pathosystem *Musa sp/Mf* wird in Abschnitt 5.3 einer kritischen Bewertung unterzogen.

5.1 Charakterisierung der Wirtsreaktionen verschiedener *Musa cv*

Die experimentellen Untersuchungen an der pflanzlichen Komponente des Pathosystems waren auf die Nutzung verschiedener *Musa cv* zur Anzucht von Geweben zur Exposition mit dem Erreger bzw. dessen Metaboliten sowie der Gewinnung und Analyse sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe gerichtet. Zur Inokulation mit dem Erregerorganismus eignen sich differenzierte Blatt- oder undifferenzierte Kallusgewebe, zur Exposition gegenüber pilzlichen Extrakten und deren Fraktionen sind isolierte Strukturen der Wirkorte (Zellorganellen, Protoplasten, Zellsuspensionen) am besten geeignet.

Zur *in vitro*-Kultur der drei ausgewählten Bananensorten mit spezifischer Reaktion gegenüber dem Pathogen wurde auf der Basis von MS-Nährmedien die von VUYLSTEKE (1989) angegebene Wachstoffsstoffkonzentration gewählt. Diese zeigte neben einer insgesamt leicht verminderten Multiplikationsrate im Vergleich zu der von OKOLE (1995) angegebenen Zusammensetzung eine konstantere Vermehrungsrate bei moderater Kallusbildung und Verbräunung. Die Multiplikationsraten von 2.96 (Dominico Hartón) bis 3.71 (Yangambi km 5) Schößlingen pro transferiertem „bud“ entsprachen über die gesamte Versuchsperiode von drei Jahren bei gleichbleibenden Inkubationsbedingungen den von ISRAELI et al (1995) für Sorten aus der Untergruppe Cavendish (Genom AAA) angegebenen. Die sukzessive Verminderung des Cytokiningehaltes von 20.0 (MS-Multiplikationsmedium) über 0.1 (MS-Regenerationsmedium) bis auf 0.0 (MS-Hardening) μM Benzylaminopurin (BAP) bei gleichzeitiger Erhöhung des Auxingehaltes im Regenerationsmedium führte zur vollständigen Differenzierung von Sproß- und Wurzelgewebe einzelner Bananenpflanzen nach dem ersten Umsetzen und zur Phototrophie zum Zeitpunkt des Überganges in die Bodenkultur. Hohe Transpirationsverluste durch die noch wenig entwickelte Kutikula wurden durch eine erhöhte Luftfeuchte (Plastikabdeckung) verhindert. Phänotypische Veränderungen traten in allen Stadien der Entwicklung auf, insbesondere bei der Sorte Dominico Hartón; die auffälligen „off-type“-Einzelpflanzen wurden von der weiteren Nutzung in der Gewebekultur ausgeschlossen. Insgesamt führte die Anwendung der *Musa sp*-Gewebekultur zu einer gleichmäßigen Bereitstellung homogener Bananenpflanzen mit verschiedenen Reaktionen gegenüber *Mf* zur weiteren Untersuchung physiologischer und biochemischer Leistungen der Wirtspflanze im Zusammenhang mit der Schwarzen Sigatokakrankheit.

Die Gewinnung undifferenzierter Gewebe und Einzelzellsuspensionen stieß auf Schwierigkeiten, die im Verlauf der Arbeit nur teilweise überwunden werden konnten: So gelang die Kultivierung von Kallusgewebe der Sorten Yangambi km 5 und Cachaco durch Inkubation kolloider Basalbereiche aus der Meristemkultur in flüssigem SH-Medium unter Zusatz der Auxine NAA und Dicamba und die nachfolgende Überführung auf Festmedium gleicher Zusammensetzung; die Anwendung der gleichen Verfahren bei der Sorte Dominico Hartón führte allerdings zu rascher Verbräunung und anschließendem Absterben des Kallus. Ein vergleichbarer Effekt ist von OKOLE (1995) bei der Verwendung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) als Auxinquelle bei der Kallusbildung beobachtet worden. Das Auftreten dieses Phänomens in Kalluskulturen von Dominico Hartón auf 2,4-D-freien Nährmedien weist auf die unterschiedliche Metabolisierung von Wuchsstoffen in verschiedenen *Musa* cv hin und erfordert weitere Untersuchungen zur Optimierung der Nährstoffversorgung in Bananen anderer genetischer Konstitution.

Die Kallusgewebe der HR- und der PR-Sorte konnten aber zur Inokulation mit Myzel des Erregers genutzt werden. Auf diese Weise gelang es, den Raum direkten Kontaktes zwischen Pathogen und Wirt vergleichend histologisch zu untersuchen: Bei *Musa* cv Yangambi km 5 verblieb das inokulierte *Mf*-Myzel oberflächlich ohne ausgedehntes Wachstum und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus unteren Kallusbereichen zeigten nur wenige kollabierte Hyphen. Bei Cachaco bildete sich eine kompakte, weiter wachsende Myzelmasse mit funktionsfähigen Penetrationshyphen bis in die unteren Lagen des Kallus. Das Fehlen von Haustorien und der enge räumliche Zusammenhang zwischen Wirts- und Erregerzellen waren weitere Belege für die Bedeutung chemischer Interaktionen im Interzellularraum der Pflanze, die von BEVERAGGI et al (1993) aufgrund von Untersuchungen infizierten Blattgewebes festgestellt worden sind. Die „dual culture“ zwischen *Musa* cv-Kallus und *Mf*-Myzel, die in der vorliegenden Arbeit nur ansatzweise experimentell genutzt wurde, war somit in der Lage, die Reaktionen innerhalb des Pathosystems in Blattgewebe als dem natürlichen Infektionsorgan zu reproduzieren und bietet die Möglichkeit, biochemische und pathophysiologische Untersuchungen ohne den Einfluß störender histologischer Faktoren oder chemischer Nebenprodukte aus chlorophyllhaltigen Zellen durchzuführen. Ob die Fähigkeit zur Synthese von Phytoalexinen auch in Kalluszellen aufrecht erhalten wird und welchen Einfluß die Zusammensetzung des Nährmediums darauf ausübt (DONOVAN et al 1990), bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Dabei ist auch die Möglichkeit zur zielgerichteten Transformation und Selektion somaklonaler Varianten mit agronomisch wünschenswerten Eigenschaften zu nutzen (SCOWCROFT et al 1983, WITHERS 1993). Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen in den Sorten Yangambi km 5 und Cachaco bilden eine Bestätigung des von BEVERAGGI et al (1993) abgeleiteten Trophieverhältnisses zwischen Wirt und Pathogen in der ersten Phase der Interaktion und der Wirksamkeit pflanzenphysiologischer Faktoren bei der Abwehr gegen den Erreger, die auch im künstlichen Pathosystem aus Wirtskallus und *Mf*-Inokulum induzierbar sind. Obwohl die Auswertung der vorliegenden TEM-Untersuchung

aufgrund der langen Inkubationsdauer keine Aussagen über die Geschwindigkeit der HR und damit deren Bedeutung als Ursache oder Begleiterscheinung der Abwehrreaktion (GABRIEL 1989, WALTON und PANACCIONE 1993) erlaubt, belegen die Verteilung und die Konstitution der *Mf*-Hyphen im Kallus von *Musa* cv Yangambi km 5 die auch von SALLÉ et al (1990) in infiziertem Blattgewebe formulierte Einschätzung eines frühen Absterbens der Erregerzellen in HR-Interaktionen.

Die Gewinnung embryogener Zellsuspensionen zur Bestimmung toxikologischer Kennwerte verschiedener *Musa* cv gegenüber Sekundärmetaboliten des Erregers konnte nicht in hinreichendem Maße erreicht werden, da die suspendierten Zellen zwar lebend und über einen längeren Zeitraum teilungsfähig blieben, aber auch nach Umsetzen auf Nährböden mit veränderter Wuchsstoffzusammensetzung keinerlei Organo- oder Embryogenese zeigten. Nach PANIS und SWENNEN (1993) ist ein wichtiger Faktor für das Wachstum embryogener Zellsuspensionen eine hohe Inokulumdichte, die bei den eigenen Versuchen mit den drei genannten *Musa* cv nicht erreicht werden konnte. Die Ergebnisse von NOVAK et al (1989) und DHED'Á et al (1991) zeigten, daß nur bei einigen Sorten diploider und heterozygoter triploider *Musa* sp sehr geringe Regenerationsraten (< 20 %) möglich sind. Die Anwendung standardisierter Versuchsprotokolle auf verschiedene Bananensorten zur Untersuchung der Interaktion mit *Mf* ist jedoch von weiteren diesbezüglichen Erfolgen unter Einbeziehung unterschiedlicher Wuchsstoffkombinationen abhängig.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten im Zusammenhang mit einer *Mf*-Infektion erfolgte beispielhaft an dem zentralen Enzym Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL), das den Metabolismus vom Substrat L-Phenylalanin des Primärstoffwechsels zum Produkt trans-Zimtsäure (CA) des Sekundärmetabolismus katalysiert (MANSFIELD 1983). Die angewendete Methode der direkten Messung von CA während der Inkubation kann unter der Voraussetzung einer mehrfachen Reinigung der Proben zur Entfärbung als geeignet bezeichnet werden, da die Zunahme der Adsorption bei 272 nm über einen Zeitraum von mehreren Stunden gleichmäßig verlief und auf eine konstante Umsetzung des Substrates hinwies; damit lag eine Enzymkinetik 0. Ordnung vor (MOHR und SCHOPFER 1992). Die Darstellung der Enzymaktivität auf die Bezugsgröße Proteingehalt ermöglichte den Vergleich zwischen den verschiedenen *Musa* cv.

Die Ergebnisse der Messungen zeigten die Aktivierung von PAL innerhalb von 10 Stunden nach Inokulation in allen drei Bananensorten und stellen damit die früheste *in planta* meßbare Reaktion dar. Dieser Wert dürfte mit der Zeitspanne der Penetration pilzlicher Hyphen durch die Stomata und der Elizitierung pflanzlicher Reaktionen übereinstimmen. Nach DIXON und LAMB (1990) erreicht die Transkription von PAL-kodierenden Genen in Bohnen-Zellsuspensionen schon 1.3 h und die Enzymaktivität 6-8 h nach Elizitorbehandlung maximale Werte. Die höchste Aktivität bei *Musa* sp wird jeweils 24 dpi erreicht und nimmt mit steigendem Grad der Resistenz gegenüber dem Erreger *Mf* zu (Yangambi km 5 > Cachaco > Dominico Hartón). Das bedeutet, daß postinfektionelle Reaktionen unmittelbar nach der Penetration der Stomata

aktiviert werden und die Pathogenese vom weiteren Verlauf der Interaktion zwischen *Musa* sp und *Mf* abhängt, die zu kompatiblen oder inkompatiblen Wirt-Pathogenverhältnissen führt. Dabei ist die PAL-Aktivierung proportional zu dem Grad der Resistenz gegenüber dem Erreger. Die Tatsache, daß eine Steigerung der Aktivierung von PAL durch den Einsatz des Wirkstoffes Tricyclazol® nur in inokulierten *Musa* cv Yangambi km 5 nachgewiesen werden konnte, kann als weiterer Beleg für den engen Zusammenhang von 2,4,8-THT und der Induktion von Abwehrmechanismen gewertet werden, der in Abschnitt 5.3 diskutiert wird.

Ob die von Luis et al (1993, 1996) beschriebenen Phytoalexine aus *Musa acuminata* über den PAL-abhängigen Shikimat- oder Phenylpropanbiosyntheseweg metabolisiert werden, läßt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Nach HAHLBROCK (1988) und FREYTAG und HAHLBROCK (1992) besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem hypersensitiven Zelltod (HR) in unmittelbarer Nähe der pilzlichen Penetrationsorgane und der systemischen Aktivierung von Abwehrmechanismen durch benachbarte Gewebe; Phytoalexine können auch toxisch auf pflanzliche Zellen wirken und somit eine hypersensitive Nekrotisierung verursachen. KIRÁLY (1980) weist in diesem Zusammenhang auf die teleologische Erklärung des Konzeptes hin, das eine „Opferung“ weniger eigener Zellen zur „Rettung“ des gesamten pflanzlichen Organismus beinhaltet. Der Zusammenhang zwischen HR und Abwehrmechanismen könnte im Falle des vorliegenden Pathosystems Schwarze Sigatokkrankheit durch die Wirkung des 2,4,8-THT in toxischen Dosen bei der Sorte Yangambi km 5 eine Rolle spielen.

Die Gewinnung von Sekundärstoffen aus dem Interzellularraum des Blattgewebes verschiedener *Musa* cv wurde durch das Vorhandensein hochviskoser Verbindungen aus den Milchröhren erschwert, die die Anwendung konventioneller Extraktionsverfahren nicht erlaubte; alternativ wurde die von KEEN (1978) beschriebene „facilitated diffusion method“ angewendet, bei der die zu untersuchenden Analyte in großen Volumina Lösungsmittel auftreten und entsprechend extrahiert werden mußten. Die gewonnenen Substanzen wurden durch TLC getrennt und auf ihre Wirksamkeit gegenüber Pilzsporen bzw. als Kulturfiltrat auf die Wirkung gegenüber dem *Mf*-Sekundärmetabolismus untersucht. Die dabei isolierte Substanz, die eine Hemmung von Pilzwachstum bewirkte, wurde HPL-chromatographisch und UV-spektrographisch charakterisiert, die Daten lassen allerdings keine Übereinstimmungen mit den von Luis et al (1993, 1996) veröffentlichten Strukturdaten der von dieser Arbeitsgruppe isolierten Phytoalexine erkennen. Möglicherweise entsprechen die postinfektionellen Metaboliten aus Yangambi km 5 einer der von MOURICHON et al (1990) isolierten Substanzen, die die Keimung und das Längenwachstum der Keimschläuche von *Mf* hemmten. Die weitere Untersuchung der isolierten Substanzen erfordert die Identifizierung der chemischen Struktur, deren Metabolismus in der Wirtspflanze sowie die Bestimmung der Wirkungen auf die natürlichen Infektionorgane des Erregers *Mf*.

5.2 Untersuchung des pilzlichen Sekundärstoffwechsels

Die Voraussetzungen zur analytischen Bestimmung von Pentaketidmetaboliten aus *Mf* zur Charakterisierung des pilzlichen Sekundärstoffwechsels wurden durch die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Extraktion und Aufbereitung der Kulturfiltrate sowie der chromatographischen Auswertung der so gewonnenen Extrakte geschaffen.

Das zur Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung entwickelte Verfahren der Probenaufbereitung orientierte sich an der Gewinnung maximaler Ausbeuten an 2,4,8-THT als wichtigem Naphtochinonderivat für die Pathogenese von *Mf* auf *Musa sp* sowie weiterer pilzlicher Metaboliten zur Analyse mittels der HPLC. Auf der Basis der Arbeiten von GREENBLATT und WHEELER (1986) wurden mehrere alternative Verfahren unter Einbeziehung verschiedener mobiler und stationärer Phasen untersucht. Die daraus entwickelte Methode der Festphasenextraktion (SPE) an Aminopropylsäulen (NH_2) und einphasigem Spülen mit Hexan vor der Elution der Analyte mit Methanol hat gegenüber anderen Verfahren der Probenaufbereitung mehrere Vorzüge: Im Vergleich zu der von STIERLE et al (1991) angewendeten Methode der Gelfiltration liegen die Analyte in einem geringen Lösungsmittelvolumen konzentriert vor, außerdem sind die gute Reproduzierbarkeit und der geringe Gerätebedarf zu erwähnen. Gegenüber der von OKOLE (1995) angewendeten TLC sind die geringeren Transferverluste sowie die Erfassung geringster Substanzmengen zur direkten Injektion in die HPLC hervorzuheben. Damit erfüllt die Probenvorbereitung durch SPE- NH_2 und die daran anschließende analytische und/oder präparative RP-HPLC die von STIERLE (1992) formulierte Grundphilosophie, daß jeder Schritt eines Trennungsschemas einen anderen Mechanismus nutzen sollte, in diesem Fall zuerst die hydrophile (SPE) und folgend die apolare Wechselwirkung (HPLC) der Analyte an der Festphase.

Zur Beurteilung der Reinheit des nach der HPLC-Trennung weiterverwendeten 2,4,8-THT zur Anwendung auf *Musa cv* ist auf die grundsätzliche Problematik bei der Gewinnung von Naturstoffen hinzuweisen: Nach YODER (1980) können scheinbar homogene Toxinpräparate vor allem aus Verunreinigungen („contaminants“) bestehen, so daß beispielsweise ein Präparat mit scheinbar hoher biologischer Aktivität von 10^{-8} M aus 99 % Verunreinigung und 1 % Toxin bestehen kann. Die Bestandteile des aus *Mf*-Kulturfiltraten isolierten 2,4,8-THT sind nach Trennung auf TLC durch MS und GC-MS-Koppelung ermittelt worden: Dabei wurden unter den gegebenen Bedingungen ein Anteil von 14.78 % bei einer Masse von $m/z = 194.05$ ermittelt, verglichen mit einem Anteil von 13.4 % für 2,4,8-THT bei STIERLE et al (1991). 4.62 % wurden bei $m/z = 176$ bestimmt und entsprechen verschiedenen Strukturisomeren von Dihydroxytetralon (Produkt der Wasserabspaltung von 2,4,8-THT). Die gleiche Probe weist nach Derivatisierung in der Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie mehrere Nebenpeaks auf, die das Vorhandensein methodenbedingter Begleitstoffe aus dem Kulturfiltrat (pilzliche Substanzen oder Nährstoffe), Lösungsmittelrückständen oder im Verlauf der

Extraktion gelösten Stoffen aus Dichtungs- und Verpackungsmaterialien in unbestimmter Größenordnung belegen. Für die Reinheit des 2,4,8-THT nach HPLC-Reinjektion, das in den Dosis-Wirkungsversuchen auf Blattgewebe verwendet wurde, ist der Anteil von durchschnittlich 90 % (UV-Detektion) als befriedigend anzusehen, wobei über die Menge und Wirkung der übrigen Substanzen (einschließlich der bei der gewählten Wellenlänge nicht detektierbaren) naturgemäß keine Aussagen getroffen werden können.

Die Gewinnung nichtverdampfbarer Rückstände nach zweimaliger Extraktion der Kulturfiltrate lag unter den gegebenen Bedingungen mit 35 mg l⁻¹ über den von UPADHYAY et al (1990) angegebenen, verblieb allerdings deutlich unterhalb der von STIERLE et al (1991) erreichten Ausbeute von 90 mg l⁻¹. Die von den Autoren angegebenen Ergebnisse enthalten jedoch keine detaillierten Angaben zu den Bedingungen der Inokulation, Inkubation und Rohextraktgewinnung. Einzelauswertungen der durch mehrmalige Extraktion gewonnenen Fraktionen zeigten jedoch, daß die Substanzen des Pentaketidbiosyntheseweges über eine sehr hohe Extraktionseffizienz verfügen (Nernst'sche Konstante $K_{2,4,8\text{-THT}} = 19$), so daß schon bei zweimaliger Extraktion mit Ethylacetat 99.7 % des 2,4,8-THT in die apolare Phase übergehen, im Gegensatz zu einer Ausbeute von nur 86.4 % der gesamten nichtverdampfenden Rückstände; im Hinblick auf die vorliegende Fragestellung ist somit die gewählte Extraktionsmethode als angemessen zu betrachten.

Ebenso ist die von STIERLE et al (1991) angegebene Inkubationsperiode von 28 Tagen zur Erreichung hoher *Mf*-Massezuwächse geeignet und orientiert sich am Wachstumsverhalten des Pilzes auf festen Nährmedien. Die eigenen Untersuchungen hierzu zeigten jedoch, daß das Myzelwachstum in Flüssigkulturen neben der Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums auch durch die Inkubationsbedingungen wie Luftzufuhr und Durchmischungsintensität beeinflußt werden, wohingegen die Konzentrationen der Pentaketid-metaboliten schon nach 12 Tagen Inkubation nicht mehr wesentlich gesteigert werden konnten. Der anhaltende Massezuwachs geht nicht mit einem Zuwachs der Substanzausbeute einher bzw. wird durch verstärkten Abbau der Metaboliten kompensiert.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der Untersuchungen an fünf geprüften *Mf*-Isolaten einen zwar unterschiedlichen Endgehalt an 2,4,8-THT, es wurden aber keine im Hinblick auf den Pentaketidmetabolismus defizienten Isolate identifiziert. Die untersuchten Isolate waren jedoch - soweit bekannt - aus natürlich infizierten *Musa sp* gewonnen worden (OKOLE 1995). Sollte die Pathogenität des Erregers gegenüber anfälligen Bananen von der Fähigkeit zur Synthese von 2,4,8-THT abhängen, dürften diesbezüglich defiziente *Mf*-Stämme auf natürlich infizierten *Musa sp* nicht auftreten, so daß eine Gewinnung entsprechender Isolate an deren Mutagenese und zielgerichtete Selektion gebunden ist.

Die Studien von WHEELER (1983) über den Melaninmetabolismus in Pilzen lassen das Vorliegen des Pentaketidbiosyntheseweges auch in *Mf* erwarten, obwohl Pilze dieser Gattung daraufhin

nicht untersucht worden sind. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen konnten in Nährlösungen von *Mf* die Naphtochinone Juglon, 3-HJ und Flaviolin sowie das Hydrochinon 2,4,8-THT nachgewiesen und quantifiziert werden. Während die Konzentrationen von Juglon und 3-HJ im Verlaufe der Inkubationsperiode auf sehr niedrigem Niveau verblieben, zeigten die Metabolite 2,4,8-THT und Flaviolin eine parallele Entwicklung mit Maximalwerten 12 Tage nach Inokulation in physiologisch relevanten Konzentrationen und Konzentrationen mit starken Schwankungen bis zum Ende der Beobachtungsperiode nach 45 Tagen. Diese Ergebnisse deuten auf eine fortgesetzte Metabolisierung und den gleichzeitigen Abbau von 2,4,8-THT durch Oxidation zu 3-HJ und/oder Dehydrierung zu 1,4,5-Trihydroxynaphtalen (WHEELER und STIPANOVIC 1985) hin, die durch eine Veränderung der Sauerstoffzufuhr im Nährmedium allerdings unbeeinflusst blieb. Die Abfolge von reduzierenden und oxidierenden Schritten im Pentaketidmetabolismus und die Beobachtung autoxidativer Prozesse (STIPANOVIC und BELL 1977) neben enzymgeregelten Syntheseleistungen (VIVIANI et al 1993) zeigten die Komplexität des untersuchten Stoffwechselsystems.

Das Zwischenprodukt Juglon wurde unter *in vitro*-Bedingungen, auch unter Verwendung von spezifischen Wirkstoffen, nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen, die unter *in vivo*-Bedingungen keine physiologisch wirksame Größenordnung erreichte. Dieses Ergebnis widerspricht damit der von einzelnen Autoren (OKOLE 1995) geäußerten Vermutung, die Spezifität untersuchter Fraktionen und Substanzen könnte durch die Wirkung des Juglon als Verunreinigung in geringen Mengen maskiert werden.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen von *Mf* unter Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol® zeigten dessen Einfluß auf die Pigmentierung des Myzels und den Gehalt an verschiedenen Pentaketidmetaboliten: Unabhängig von der Pigmentierung des Luftmyzels verschiedener *Mf*-Isolate führt Tricyclazol® zu einer intensiven Braunfärbung des PDA-Nährmediums und bei einer Dosis von 1.0 mM zu einer deutlichen Verminderung des Massewachstums. Die Intensität der Braunfärbung war positiv korreliert mit der Steigerung des Gehaltes an 2,4,8-THT in verschiedenen Isolaten des Erregers, so daß der von NATURAL (1990) abgeleitete positive Zusammenhang zwischen der Pigmentierung und der Toxinproduktion von *Mf* durch die hier vorgenommene Betrachtung einzelner Metaboliten bestätigt werden konnte.

Der Einsatz von Tricyclazol® ging auf die von STIERLE et al (1991) formulierte Hypothese zurück, der Wirkstoff könne die Produktion von 2,4,8-THT und damit die Pathogenität des Erregers *Mf* gegenüber der Wirtspflanze *Musa sp* steigern. Unter *in vitro*-Bedingungen führte die Anwendung von Tricyclazol® bis zu einer Konzentration von 1.0 mM zu einer Steigerung des Gehaltes an 2,4,8-THT um das bis zu 15fache; die Gehalte an Flaviolin entwickelten sich parallel dazu, während die beiden Naphtochinone Juglon und 3-HJ keine Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zeigten. Diese Ergebnisse bestätigen zunächst das Vorliegen des von WHEELER und STIPANOVIC (1985) bestimmten Pentaketidbiosyntheseweges in pilzlichen

Organismen, wobei aus den genannten methodischen Gründen 2-HJ nicht nachweisbar war. Ebenso wie von TOKOUSBALIDES und SISLER (1979) nach Tricyclazol®-Behandlung bei *Verticillium dahliae* festgestellt, führte die Hemmung der 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalin-Reduktase zu einer Akkumulation von Flaviolin und der Steigerung des Metabolismus über Juglon und andere Zwischenprodukte zu 2,4,8-THT. Eine Hemmung des Reduktionsschrittes von 3-HJ zu 2,4,8-THT, wie von WHEELER und STIPANOVIC (1985) bei *Wangiella dermatitidis* festgestellt, konnte für *Mf* nicht nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang ist auch der Einfluß von Blattextrakten verschiedener *Musa cv* auf den Metabolismus von *Mf* zu diskutieren: Eine deutliche Steigerung des Gehaltes an 2,4,8-THT wurde durch die Inkubation des Erregers in Nährsubstraten erreicht, die aus der HR- und PR-Sorten Yangambi km 5 und Cachaco gewonnen wurden. Diese Förderung des pilzlichen Metabolismus durch Substanzen aus *Musa cv* war am deutlichsten in Substraten, die präinfektionell in Blattgewebe resistenter Wirtspflanzen gewonnen wurden. Die fördernde Wirkung von pflanzeigenen Substanzen auf den Pentaketidstoffwechsel von *Mf* war damit vergleichbar den Ergebnissen von PINKERTON und STROBEL (1976) innerhalb des Pathosystems Zuckerrohr/*Bipolaris sacchari*: Die Autoren untersuchten Blattfiltrate verschiedener Sorten und isolierten aus der anfälligen Zuckerrohrsorte 51-NG97 einen als Serinol identifizierten Aktivator, der unter *in vitro*-Bedingungen die Synthese des wirtsspezifischen Toxins Helminthosporosid förderte. Im Gegensatz zu den bei *Musa sp/Mf* gefundenen Ergebnissen wurde Serinol aber nur bei der anfälligen, nicht bei der resistenten Sorte gefunden. Das bedeutet für die vorliegende Fragestellung, daß aktivierende Substanzen aus dem Wirtsgewebe resistenter *Musa cv* sortenspezifische Wirkungen auf den pilzlichen Metabolismus ausüben und dadurch wiederum Abwehrmechanismen der Pflanze induzieren. Das Ergebnis dieser Interaktion führt zur Inkompatibilität zwischen Wirtspflanze und Erreger. Dabei sind im Falle des Serinol folgende Mechanismen der Aktivierung des pilzlichen Stoffwechsels diskutiert worden (PINKERTON und STROBEL 1976), die auch im inkompatiblen Wirt-Pathogenverhältnis *Musa cv/Mf* wirksam werden können: (1) Als Vorstufe des 2,4,8-THT, da auch pflanzliche Organismen über den Acetat-Polymalonat-Biosyntheseweg verfügen (MANSFIELD 1983); (2) als Induktor der 2,4,8-THT-Synthese; (3) als Einflußfaktor für die Enzymsysteme, die in den Metabolismus einbezogen sind, vergleichbar mit der Wirkung des synthetischen Hemmstoffes Tricyclazol®. Eine weitergehende Analyse der biochemischen und physiologischen Grundlagen des Mechanismus setzt jedoch die Isolierung und Identifizierung der verantwortlichen Substanz voraus.

Damit ist der Pentaketidmetabolismus des Erregers *Mf* als ein sekundärer Stoffwechselmechanismus zu betrachten, der sehr spezifisch sowohl auf synthetische Wirkstoffe wie Tricyclazol® sowie auf Bestandteile pflanzlicher Extrakte resistenter *Musa cv* reagiert. Die unter *in vitro*-Bedingungen bei Tricyclazol®-Anwendung festgestellte Steigerung des Gehaltes an 2,4,8-THT bei gleichbleibenden Gehalten an Juglon und 3-HJ machte einen Einsatz des Wirkstoffes unter *in vivo*-Bedingungen sinnvoll, durch den die dosisabhängige Wirkung des

2,4,8-THT auf Gewebe von *Musa cv in planta* untersucht werden konnte (siehe folgenden Abschnitt).

5.3 Bestimmung der kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogeninteraktionen

5.3.1 Kritische Überprüfung des HST-Postulates im Pathosystem *Musa sp/Mf*

Der Postulierung des 2,4,8-THT als HST in der Pathogenese von *Mf* (STIERLE et al 1991) gingen teilweise beeindruckende empirische Befunde zur Rolle spezifischer Toxine in anderen pflanzenpathologischen Modellsystemen voraus. Seit der Bestimmung der inzwischen klassischen Beispiele von HST, des Victorin (HC-Toxin) von *Cochliobolus victoriae* in Hafer in den späten 40er Jahren und des HMT-Toxins von *Cochliobolus heterostrophus* in Mais zu Beginn der 70er Jahre, ist die Anzahl pilzlicher Metaboliten, die als HST eingestuft wurden, ständig gewachsen: SCHEFFER listete 1976 schon zehn wirtsspezifische Toxine, SCHEFFER und LIVINGSTON (1984) 14 und STIERLE et al (1992) 15 HST auf; in der Mehrzahl stammten diese von Pathogenen der Gattungen *Alternaria* auf Obst und *Cochliobolus* (*Helminthosporium*) auf Nutzgräsern. Die Basis der Spezifität bildet die jeweils niedrigste taxonomische Ebene der Pflanzensorte bzw. des Kultivar (*cv*) und der Erregerrasse bzw. des Pathotyps. Die bisher unter dem Begriff HST zusammengefaßten Substanzen sind hinsichtlich ihrer Wirkung im kompatiblen Wirt-Pathogenkomplex vergleichbar, verfügen aber über unterschiedliche chemische Strukturen: Es handelt sich um niedermolekulare Verbindungen (MW < 800 Da), die zu den Alkaloiden, Glykosiden, Phenolen, Polyketiden, Terpenen und anderen Klassen organischer Verbindungen gehören (KOHMOTO und OTANI 1991, STIERLE et al 1992).

Insgesamt ist die Bedeutung der Toxine für die Pathogenese und der HST für die Spezifität von Wirt-Pathogeninteraktionen weiterhin ein kontrovers diskutiertes Thema: Dabei reichen die Positionen von Gäumanns Diktum aus den 50er Jahren, alle Pflanzenpathogene seien toxinbildend, bis zu dem Kommentar von Day, daß Toxine keine bedeutenden Faktoren der Pathogenität seien (zit. n. WHEELER 1981). WALTON und PANACCIONE (1993) sprechen von einer konzeptionellen Polarisierung innerhalb der Phytopathologen, die den HST einerseits geradezu mythische Eigenschaften zuschreiben oder diese andererseits als Seltsamkeiten („oddities“) ablehnen.

Im Verlaufe der Untersuchungen verschiedener Pathosysteme und deren toxischer Metaboliten konnte sich unter der Evidenz weiterer empirischer Belege eine konzeptionelle Neubewertung der zunächst als Toxine im engeren Sinne definierten Substanzen durchsetzen, die durch folgende Beispiele veranschaulicht werden soll:

Beispiel 1: Pathosystem Hafer/ <i>Cochliobolus victoriae</i> und <i>Puccinia coronata</i>
--

In den 40er Jahren wurde in den USA der Anbau von Hafersorten ausgeweitet, die das Resistenzgen Pc-2 gegen den Erreger des Haferkronenrostes (*Puccinia coronata*) exprimierten; innerhalb weniger Anbauperioden wurde auf den rostresistenten Hafersorten ein neuer Blattfleckenerreger als *Cochliobolus carbonum* identifiziert, für dessen Pathogenität das HST Victorin (HC-Toxin) verantwortlich gemacht wurde (PRINGLE und SCHEFFER 1964, ELLINGBOE 1976). Das phänotypische Auftreten von Victorinsensitivität und Rostresistenz innerhalb desselben Genotyps führte zu der Hypothese, daß dasselbe Gen für beide Reaktionen gegenüber den genannten Pathogenen verantwortlich sei. Untersuchungen des Resistenzmechanismus gegenüber *Puccinia coronata* zeigten, daß eine verstärkte Synthese des Phytoalexins Avenalin eine Abwehr des Erregers bewirkte; Avenalin ist allerdings unwirksam gegen den Erreger der Blattfleckenkrankheit. Das für die Pathogenese und Symptomausprägung von *Cochliobolus victoriae* verantwortliche HST Victorin wurde schließlich als Elizitor für die Avenalinproduktion und damit die Resistenz gegen den Erreger des Haferkronenrostes erkannt (MAYAMA et al 1986). Damit wurde die klassische Rolle des pilzlichen Metaboliten als Toxin in der kompatiblen Wirt-Pathogenbeziehung um eine nachgewiesene Funktion als Elizitor in der inkompatiblen Interaktion ergänzt (KEEN 1986).

Beispiel 2: Pathosystem Tomate/*Cladosporium fulvum*

Der Erreger der Blattflecken- und Fruchtfäulekrankheit der Tomate, *Cladosporium fulvum*, ist als langsam wachsender, hemibiotropher Pilz beschrieben worden, der die Pflanze durch die Stomata penetriert und sich ohne Haustorienbildung im Interzellularraum entwickelt (KAARS SIJPESTEIJN 1976, DE WIT und TOMA 1986). Die pflanzlichen Reaktionen auf das Pathogen reichen von denen anfälliger über die teilweise resistenter Sorten (extensives Myzelwachstum) bis zur HR unmittelbar nach Inokulation (LAZAROVITS und HIGGINS 1979). Aus dem Apoplasten infizierter Tomaten konnten Produkte des pilzlichen Stoffwechsels isoliert werden, die zunächst aufgrund ihrer Wirkung als spezifische Toxine oder Nekrose-induzierende Elizitoren bezeichnet wurden (DE WIT und SPIKMAN 1982). Diese *in planta* produzierten Erregersubstanzen wurden schließlich als Produkt des Avirulenzgenes AVR9 identifiziert und induzieren die HR in inkompatiblen Wirt-Pathogenbeziehungen bei resistenten Cf9-Tomatensorten (DE WIT et al 1993b).

Diese Beispiele trugen zu einer veränderten Funktionsbestimmung und terminologischen Neudefinition von Substanzen bei, deren Eigenschaften sie zunächst als Toxine gekennzeichnet hatten. So formulierte BELL (1981) die Idee von Toxinen als Hyperelizitoren der pflanzlichen Abwehrreaktionen, soweit durch diese neben der direkten nekrotischen Wirkung auch Mechanismen induziert wurden, die die Pathogenese hemmten. Im entgegengesetzten Sinne entwickelten NISHIMURA und KOHMOTO (1983) die Konzeption von Toxinen als Suppressoren der allgemeinen Abwehr gegen Pathogene in Pflanzen. WALTON und PANACCIONE (1993) sprechen von „nichttoxischen Toxinen“, die als wirtsspezifische Suppressoren bezeichnet werden können, da sie gerade die pflanzliche Abwehrreaktion unterdrücken.

Insgesamt gilt, daß für alle Pilze (außer den obligat biotrophen) der pflanzliche Zelltod sowohl mit Resistenz als auch mit Anfälligkeit der Wirtspflanze gegenüber dem Krankheitserreger verbunden sein kann (BAILEY und O'CONNELL 1989). Pilzliche Metaboliten werden als Toxine bezeichnet, wenn die produzierenden Organismen nekrotroph sind, wohingegen Sekundärmetaboliten biotropher Erreger als Produkte der Avirulenzgene angesehen werden (GABRIEL 1989). Nach WALTON und PANACCIONE (1993) ist weder für Elizitoren noch für HST eine Unterscheidung möglich zwischen dem Zelltod als Symptom oder als auslösendem Faktor des Pathotyps.

Zusammenfassend kann von ambivalenten Funktionen pilzlicher Substanzen ausgegangen werden, die aufgrund ihrer unmittelbaren gewebeschädigenden Wirkung unter der Kategorie Toxin bzw. HST subsumiert wurden: Diese können als Elizitoren in inkompatiblen oder als Suppressoren in kompatiblen Wirt-Pathogeninteraktionen sekundäre (Beispiel Hafer/Victorin und Haferkronenrost) bzw. alternative Funktionen (Beispiel Tomate/*Cladosporium fulvum*) erfüllen:

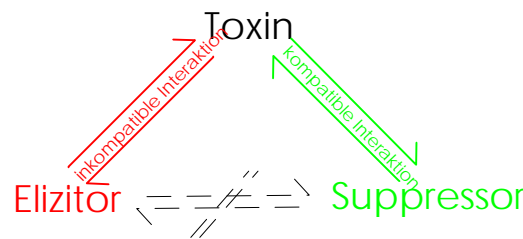


Abb. 42 Beziehungen zwischen der direkten Wirkung von Toxinen und deren mögliche Funktionen in kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogenverhältnissen

Zur Frage der Funktionen pilzlicher Metaboliten im hier untersuchten Pathosystems *Musa sp/Mf* bildeten die in Abschnitt 2.4.2 referierten Trophieverhältnisse sowie die Ergebnisse der Inokulationen von Blatt- (4.3.1) und Kallusgewebe (4.3.2) den Ausgangspunkt für die weitere experimentelle Untersuchung. Die hemibiotrophe Ernährungsweise des Pathogens rechtfertigte und erforderte die Überwindung der in der bisherigen Forschung praktizierten Arbeitsteilung zwischen Physiologen und Biochemikern einerseits, die vorwiegend die Untersuchung von Abwehrmechanismen in inkompatiblen Interaktionen zum Gegenstand hatten, und Genetikern andererseits, deren Experimentalsysteme aus biotrophen Pilzen in kompatiblen Wirt-Pathogenverhältnissen bestanden (GABRIEL und ROLFE 1990). Im Pathosystem *Musa sp/Mf* sprechen die Ergebnisse der Inokulationsversuche zudem für das Vorliegen einer stetigen Reaktionsskala von anfällig bis resistent mit einem auch unter *in vitro*-Bedingungen gut erkennbaren PR-Phänotyp, der die Einbeziehung von drei Bananensorten (HR, PR, S) in die Untersuchung rechtfertigte.

Die bei verschiedenen Sorten aufgetretenen nekrotischen Symptome (HR bei der resistenten Sorte Yangambi km 5 unmittelbar nach Inokulation, Nekrotrophie bei der anfälligen Sorte Dominico Hartón in der fortgeschrittenen Phase der Pathogenese) legen dabei die Formulierung einer **alternativen Hypothese** nahe, nach der der pilzliche Metabolit 2,4,8-THT unterschiedliche Funktionen in verschiedenen *Musa cv* ausübt:

Als **Elizitor** von Abwehrreaktionen in Verbindung mit dem Phänomen der hypersensitiven Reaktion (HR) in der Frühphase der Interaktion zwischen resistenter *Musa cv* und dem Pathogen *Mf* sowie als „klassisches“ **Toxin** in der nekrotrophen Phase der Pathogenese in kompatiblen Reaktionen zwischen anfälligen Sorten und dem Erreger.

Diese Hypothese soll im folgenden mit den in der diesbezüglichen Literatur dokumentierten Daten aus anderen Pathosystemen sowie den Ergebnissen der eigenen Arbeit diskutiert werden.

In bezug auf die Bestimmung der Spezifität der zu untersuchenden Sekundärstoffe erlaubten die verschiedenen und teilweise widersprüchlichen Literaturangaben zur Sensitivität von *Musa cv* gegenüber *Mf*-Metaboliten kein schlüssiges Urteil, da sowohl der Reinheitsgrad der verwendeten Substanzen als auch die angewandte Applikationsmethode der verschiedenen Untersuchungen entweder nicht übereinstimmten oder nicht hinreichend beschrieben wurden, so daß ein Vergleich nicht sinnvoll erscheint. Soweit vergleichbare Methoden der Substanzgewinnung und -applikation angewendet worden sind, liegen widersprüchliche Aussagen verschiedener Autoren vor: Die Angaben reichen dabei von der Feststellung der Wirtsspezifität verdünnter *Mf*-Rohextrakte (MOLINA und KRAUSZ 1989) über die Beobachtung unterschiedlicher Sensitivitäten verschiedener *Musa cv* gegenüber 2,4,8-THT (STIERLE et al 1991, NOVAK et al 1993, OKOLE 1995) bis zu Ergebnissen, die weder mit Rohextrakten noch mit einzelnen Fraktionen eine *Musa cv*-spezifische Sensitivität analog der Anfälligkeit gegenüber *Mf* bestimmen konnten (UPADHYAY et al 1990, NATURAL 1990, LEPOIVRE et al 1993).

Demzufolge bestand die Notwendigkeit, Dosis-Wirkungsbeziehungen mehrerer Fraktionen in den verschiedenen *Musa cv* durch die Anwendung reproduzierbarer Methoden zur Probenaufbereitung, Isolierung und anschließenden Exposition gegenüber Wirtspflanzengewebe zu bestimmen. Diese Aufgabe wurde unterstrichen durch die zugrundeliegende Definition der Toxine als Substanzen mit pflanzengewebebeschädigender Wirkung unabhängig von ihrer Struktur oder Herkunft (STIERLE 1992); besondere Berücksichtigung erforderte demzufolge die Bestimmung von Konzentrationen auf molarer Basis, die einen Vergleich von verschiedenen Substanzen bezüglich ihrer Wirkung ermöglicht.

Die Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung erfolgte mit *Mf*-Rohextrakt, mit der durch SPE nach Hexanspülung gewonnenen Fraktion, mit 2,4,8-THT und Juglon. Die Ergebnisse unter Anwendung der „leaf-puncture-wound overlay technique“ lassen sich mit der Aussage zusammenfassen, daß alle drei *Musa cv* gegenüber allen geprüften *Mf*-Fraktionen und Substanzen eine unterschiedliche Sensitivität aufwiesen, die jedoch nur im Falle des 2,4,8-THT eine Prüfung bezüglich der postulierten wirtsspezifischen Toxizität aussichtsreich erscheinen ließ. Dazu sind Dosen von 0.1 bis 50.0 mM 2,4,8-THT mit einer „nominellen Reinheit“ (UV-Detektion, siehe auch Abschnitt 5.2) von durchschnittlich >90 % angewendet und die jeweilige nekrotische Wirkung auf Blattgewebe mit der beschriebenen Methode bestimmt worden. Daraus sind durch potenzierte Regressionsgleichungen für jede verwendete *Musa cv* Selektivitätsindizes abgeleitet worden: Im Falle der Selektivität von 2,4,8-THT ergeben die eigenen Ergebnisse Indizes von 4.47 (Cachaco, PR) und 7.44 (Yangambi km 5, HR) gegenüber Dominico Hartón (S). Gemessen an dem Kriterium von DALY und KNOCH (1982) wurde damit die Mindestbedingung (Selektivitätsindex ≥ 10) zur Klassifizierung dieser Substanz als wirtsspezifisches Toxin in den *Musa cv* Yangambi km 5 und Cachaco nicht erfüllt. Nach WHEELER (1976) liegen die Selektivitätsindizes von HST zwischen 25 (HMT-Toxin in Mais) und 400'000 (Victorin in Hafer).

Damit konnte in keiner der experimentell durchgeführten Expositionen von Wirtsgewebe gegenüber *Mf*-Extrakten und deren Fraktionen hinreichende Spezifität auf der Ebene von *Musa cv* bestimmt werden, die auf das Vorhandensein spezifischer Insensitivität (Mechanismen zum Abbau, zur Nichterkennung oder zur raschen Regeneration geschädigter Zellen; DURBIN 1983) schließen lassen. Vielmehr stehen geringe Sensitivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Bananensorten großen Unterschieden zwischen verschiedenen Applikationstechniken gegenüber, so daß sich die aufgetretenen Widersprüche zwischen den Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen eher durch methodische Unterschiede erklären lassen. Die Untersuchungen mit nachgewiesenermaßen unspezifischen Toxinen wie Juglon (NOVAK et al 1993) unter Anwendung verschiedener Applikationstechniken („leaf-puncture-wound overlay technique“ nach STIERLE 1992, „leaf disk infiltration technique“ nach LEPOIVRE und ACUNA 1990) sprechen für die Wirksamkeit morphologischer Einflüsse (unterschiedliche Stomataverteilung und -durchmesser bzw. -öffnung, Adsorption von Substanzen im kutikulären Bereich usw.), die bei der Anwendung von Vakuuminfiltrationstechniken überwunden werden. Die bei Yangambi km 5 gemessene höhere Leitfähigkeit und damit geringere Insensitivität gegenüber Juglon ist damit als Ergebnis eines engeren Kontaktes zwischen dem Analyt und dem hypothetischen Wirkungsort wie Plasmalemma und Zellorganellen anzusehen.

Weiterhin ist bei allen Versuchen unter Verwendung von Naturprodukten wie dem 2,4,8-THT die fehlende Standardisierung der Gewinnungsmethoden zu berücksichtigen, die oftmals nicht einmal einen Vergleich zwischen verschiedenen Ergebnissen erlauben: Mit Ausnahme des Juglon müssen alle untersuchten Pentaketidmetaboliten aus Kulturfiltraten gewonnen werden, wobei die Inkubations- ebenso wenig wie die Extraktions- und Reinigungsbedingungen standardisiert sind und die eingesetzten Substanzen keineswegs die von YODER (1981) geforderten Kriterien zur Reinheit erfüllen. Unterschiedliche Befunde zur Wirkung von Toxinen sind somit grundsätzlich erklärbar durch verschiedene Trenn- und Reinigungsverfahren, die die Reinheit der betreffenden Substanz beeinflussen. Weitergehende Aussagen können aber oft nicht getroffen werden, da die veröffentlichten Daten keine Hinweise auf sekundäre Bestandteile der als „rein“ bezeichneten Toxinfraktionen geben.

Insgesamt entsprechen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen bezüglich der Wirtsspezifität von *Mf*-Metaboliten der jeweils von LEPOIVRE et al (1993) und von OKOLE (1995) formulierten Schlußfolgerung, die Inkompatibilität der HR-Sorten von *Musa cv* beruhe nicht auf einer Insensitivität gegenüber dem bzw. den *Mf*-Toxin(en) und diese spielten keine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Pathogenese. Diese Einschätzung wird durch einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der *in vitro*-Kultur von *Mf* mit den Ergebnissen der *in vivo*-Inokulation verschiedener *Musa cv* mit dem Myzel des Erregers unterstützt: Auf der einen Seite wichen die Konzentrationen an 2,4,8-THT in verschiedenen *Mf*-Isolaten nach Inkubation in Nährlösungen deutlich voneinander ab (siehe Abbildung 22), auf der anderen Seite

ließen die Inokulationen von *Musa cv* mit verschiedenen pilzlichen Isolaten keinerlei Unterschiede in ihrer Pathogenität oder Virulenz gegenüber der Wirtspflanze erkennen, die mit dem *in vitro*-Gehalt an 2,4,8-THT korreliert sind.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Frage nach der Spezifität pilzlicher Metaboliten in Wirt-Pathogeninteraktionen kann durch eine Anwendung des von WALTON und PANACCIONE (1993) formulierten Diktums gewonnen werden, demzufolge die Bedeutung von HST durch eine Analyse der genetischen Korrelation verschiedener Wirtspflanzen und Pathotypen des Erregers untersucht werden kann:

Bezüglich des Pathosystems *Musa sp/Mf* sind unter Berücksichtigung der kurzen evolutiven Entwicklung in wenigen Jahrzehnten (STOVER 1978) folgende Ableitungen zu formulieren: Der Erreger befällt Bananensorten der taxonomischen Untergruppe Cavendish (Genom AAA), die seit den 30er Jahren zur Bekämpfung der Panamakrankheit (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) in allen Anbauregionen eingeführt worden sind (JEGER et al 1995). *Mf*-Pathogene fanden also genotypisch weitgehend uniforme Bestände vor, die durch die vorherrschende Vermehrung durch Klonung nur über einen sehr begrenzten Genpool verfügen und diesen infolge von Sterilität weitgehend konservieren (PRICE 1995). Die Beobachtung eines engen zeitlichen Zusammenhanges von der Einführung homogener Wirtspflanzen und dem Auftreten der bis dahin unbekannten Schwarzen Sigatokakrankheit legt den Vergleich mit den „klassischen“ Beispielen von Pathosystemen nahe, in denen HST eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen: Die Einführung von Haferkronenrost-resistenten Sorten und deren Anfälligkeit gegenüber Victorin und dessen Erreger *Cochliobolus carbonum* (siehe Beispiel 1), die Ausdehnung der Anbaufläche von TMS-Mais und nachfolgende Verbreitung des Erregers *Cochliobolus heterostrophus* mit dem wirtsspezifischen HMT-Toxin, sowie die Einführung der Birnensorte Nijisseiki in Japan und das Auftreten der Schwarzfleckenkrankheit durch den Erreger *Alternaria kikuchiana* mit den AK-Toxinen 1 und 2 (PRINGLE und SCHEFFER 1964, NISHIMURA und KOHMOTO 1983) standen in engem chronologischen Zusammenhang. Dieser ist im Falle von *Musa sp/Mf* jedoch deutlich geringer ausgeprägt, da der Erreger auch Bananenpflanzen anderer genetischer Zusammensetzung befällt (Abschnitt 2.4.4, Tabelle 3) und die Reaktionen gegenüber dem Pathogen nicht nur qualitativ (anfällig vs resistent, sensitiv vs insensitiv), sondern quantitativ (graduelle Skalierung) beschreibbar sind.

Seitens des Erregerorganismus sprechen dessen spätes Auftreten und schnelle Ausbreitung für mutative Veränderungen an einem oder wenigen für die Kodierung von Pathogenität und Virulenz verantwortlichen Genloci, durch die sich aus einem hypothetisch vorhandenen Apathogen bzw. unbedeutendem Saprophyten innerhalb kurzer Zeit der bedeutendste pilzliche Krankheitserreger der Wirtspflanze *Musa sp* evolutiv entwickeln konnte. Bei Vorhandensein des Pentaketid-Metabolismus innerhalb von *Mf* (WHEELER 1983) kann schon die Veränderung eines einzigen Enzymes, wie z. B. durch die Hemmung zweier spezifischer Reduktasen durch den synthetischen Wirkstoff Tricyclazol[®] experimentell belegt, die Synthese von 2,4,8-THT

und damit die Interaktionen zu *Musa cv* entscheidend beeinflussen. Ein weiteres Indiz für eine mono- oder oligogene Basis von Pathogenität und Virulenz ist in dem von FULLERTON und OLSEN (1995) beobachteten „breakdown of resistance“ der HR-Sorten Paka (Genom AA) und T8 (AAAA) gegenüber *Mf* zu sehen, die allerdings in den Resistenzausprägungen multipler rezessiver Allele (vgl. Abschnitt 2.4.4) sehr unwahrscheinlich sind.

Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit wurde mit der Verwendung von drei *Musa cv* eine die gesamte Spannbreite der Reaktionen gegenüber *Mf* repräsentierende Auswahl getroffen. Die verwendeten *Musa cv* unterscheiden sich allerdings aufgrund ihrer genetischen Konstitution in sehr vielen Merkmalen voneinander; eine genetische Analyse der Nachkommenschaft ist aufgrund der Gametensterilität nicht möglich. Im Falle des Erregerorganismus *Mf* erforderte die fehlende Bestimmung physiologischer Rassen eine Überprüfung der verfügbaren Isolate im Hinblick auf ihre Pathogenität und Virulenz gegenüber *Musa cv* sowie eine Analyse von ausgewählten Sekundärmetaboliten, die mit der Fähigkeit zur Pathogenese in Verbindung gebracht werden.

5.3.2 Funktionen des 2,4,8-THT in kompatiblen und inkompatiblen *Musa cv*/*Mf*-Interaktionen

Die Interpretation der Untersuchungen zur Spezifität verschiedener *Musa cv* gegenüber *Mf*-Sekundärstoffen einerseits sowie deren Reaktionen gegenüber einer Inokulation mit dem Myzel des Erregers *Mf* andererseits sind dahingehend zusammenzufassen, daß die pflanzliche Abwehr gegenüber dem Pathogen und dessen Metaboliten in der Frühphase inkompatibler Interaktionen nicht auf einer verminderten Sensitivität resistenter Sorten beruht. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse muß die Funktion pilzlicher Substanzen innerhalb des Pathosystems unabhängig von der postulierten Rolle als HST bestimmt werden. Dabei ist dem 2,4,8-THT als derjenigen Substanz, die unter *in vitro*-Bedingungen bedeutende Gehalte aufweist und durch natürliche und synthetische Wirkstoffe stark gesteigert werden kann, eine besondere Bedeutung zuzumessen.

In diesem Zusammenhang bot das *in vivo*-Versuchssystem inokulierter *Musa cv* unter Anwendung von Tricyclazol® die Möglichkeit, die Wirkungen einer gesteigerten 2,4,8-THT-Synthese auf den pflanzlichen Interzellularraum unter naturnahen Infektionsbedingungen zu untersuchen. Die Ergebnisse der diesbezüglichen *in vitro*-Versuche an *Mf*-Nährsuspensionen lassen einen höheren Gehalt an 2,4,8-THT und eine dadurch hervorgerufene schnellere Ausprägung der Blattsymptome mit früherem Erreichen der nekrotrophen Phase erwarten; tatsächlich wurde durch die Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol® das Erreichen von Stadium 2 der Symptomentwicklung (Skalierung nach FULLERTON und OLSEN 1991) bei allen drei *Musa cv* einschließlich der HR-Sorte Yangambi km 5 schon innerhalb von 10 Tagen nach Inokulation und Wirkstoff-Applikation erreicht. Dieser Wirkstoff, der als Fungizid in Pathosystemen eingesetzt wird, deren Erreger durch eine Hemmung der Melaninbiosynthese ihre

Pathogenität einbüßen (*Pyricularia oryzae* in Reis [VIVIANI et al 1993, KAWAMURA et al 1997]), führt bei Anwendung gegenüber *Mf* in *Musa sp* zu einer gegenteiligen Wirkung: Die Hemmung des Reduktasesystems zur Biosynthese von Melanin führte zur Akkumulation des Zwischenproduktes Flaviolin und zu einem verstärkten Aufbau von 2,4,8-THT, durch dessen Wirkung in allen experimentell untersuchten Bananensorten eine schnellere und stärkere Nekrotisierung erreicht wurde. Damit liegt ein weiterer Beleg für die geringe Spezifität des untersuchten 2,4,8-THT gegenüber verschiedenen *Musa cv* vor, setzt doch die Hypothese einer höheren Insensitivität resistenter Bananen die deutlich verringerte Ausprägung nekrotischer Symptome im Vergleich zu anfälligen Sorten voraus. Die schnelle Entwicklung von Blattnekrosen in Yangambi km 5 bei Anwendung von Tricyclazol® bestätigt dagegen die Ergebnisse geringer Wirtsspezifität in den Dosis-Wirkungsbeziehungen verschiedener *Musa cv*.

Damit kann 2,4,8-THT zunächst als **Virulenzfaktor** angesehen werden, der unter natürlichen Bedingungen nach erfolgreicher Infektion und Besiedelung der Wirtspflanze wesentlich an der Symptomausprägung in der späten (nekrotischen) Phase der kompatiblen Wirt-Pathogeninteraktion beteiligt ist. Diese Bestimmung entspricht der von JONES (1990) beschriebenen Rolle von Toxinen als sekundären Faktoren innerhalb von Pathosystemen, in denen die physiologische Konzentration des Metaboliten im Wirtsgewebe zur Virulenz des Erregers proportional ist.

Im Falle der weitgehenden Nekrotisierung der gesamten Blattspreite durch die Wirkung des Tricyclazol® auf die Produktion von 2,4,8-THT wurde jedoch gleichzeitig die weitere Ausbreitung des Pilzes bei vollständiger Symptomentwicklung in allen *Musa cv* gehemmt und die Entwicklung eines kompatiblen Wirt-Pathogenverhältnisses verhindert. Gleichzeitig deuten die nekrotischen Bereiche auf der nichtinokulierten Blatthälfte auf die Wirksamkeit des von WHEELER (1981) als Telepathogenese bezeichneten Phänomens hin, das als räumlich entfernte Krankheitsursache ohne physischen Kontakt mit der Pflanze definiert worden ist. Demnach führt eine gesteigerte Synthese von 2,4,8-THT zu einer Dislozierung der Substanz im Blattgewebe über die Mittelrippe hinaus und zur Ausprägung von nekrotischen Symptomen in räumlicher Distanz zu den Penetrationshyphen von *Mf*.

Die Wirkung einer kombinierten Behandlung durch *Mf*-Inokulation und Anwendung des Wirkstoffes Tricyclazol® kann in Anlehnung an die Ergebnisse von DE WIT et al (1993a) im Pathosystem Tomate/*Cladosporium fulvum* als „zerstörerische HR“ interpretiert werden, bei der die Induktion eines pflanzlichen Abwehrmechanismus in Zusammenhang mit dem hypersensitiven Absterben von Pflanzenzellen nicht auf die unmittelbare Umgebung des Pathogens beschränkt bleibt, sondern systemisch die gesamte Pflanze erfaßt.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auch im Fall von *Musa sp/Mf* auf einen Zusammenhang zwischen der Nekrotisierung von Blattgewebe auf der einen Seite und der Induktion von Resistenzmechanismen auf der anderen Seite hin, die auch der Diskussion um die Rolle von

pilzlichen Sekundärmetaboliten in den beiden angesprochenen Beispielen, Hafer und Tomate, zugrundeliegen: Damit ist die experimentelle Anwendung von *Mf*-Extrakten und deren Bestandteilen wie 2,4,8-THT zur Selektion resistenter Bananenpflanzen nicht mehr durch die spezifische Insensitivität gegenüber den Erregersubstraten zu erklären, sondern durch die Elizitierung pflanzlicher Abwehrmechanismen in den benachbarten Bereichen nekrotisierter Zellen. Auch durch subletale Dosen der pilzlichen Substanzen kann ein erhöhtes Maß an Resistenz gegenüber dem Pathogen induziert werden (LAZAROVITS und HIGGINS 1979). Wie beständig die auf diese Weise gewonnenen Adaptationen eine Abwehr von Pathogenen bewirken und welches Maß an Spezifität den Mechanismen zugrunde liegt, kann nur durch weitere diesbezügliche Untersuchungen bestimmt werden. Die postinfektionelle Aktivierung von PAL in selektierten und regenerierten *Musa* cv Horn (OKOLE 1995) deutet auf die Wirksamkeit von Abwehrmechanismen hin, die auch in der resistenten Sorte Yangambi km 5 nachgewiesen worden sind.

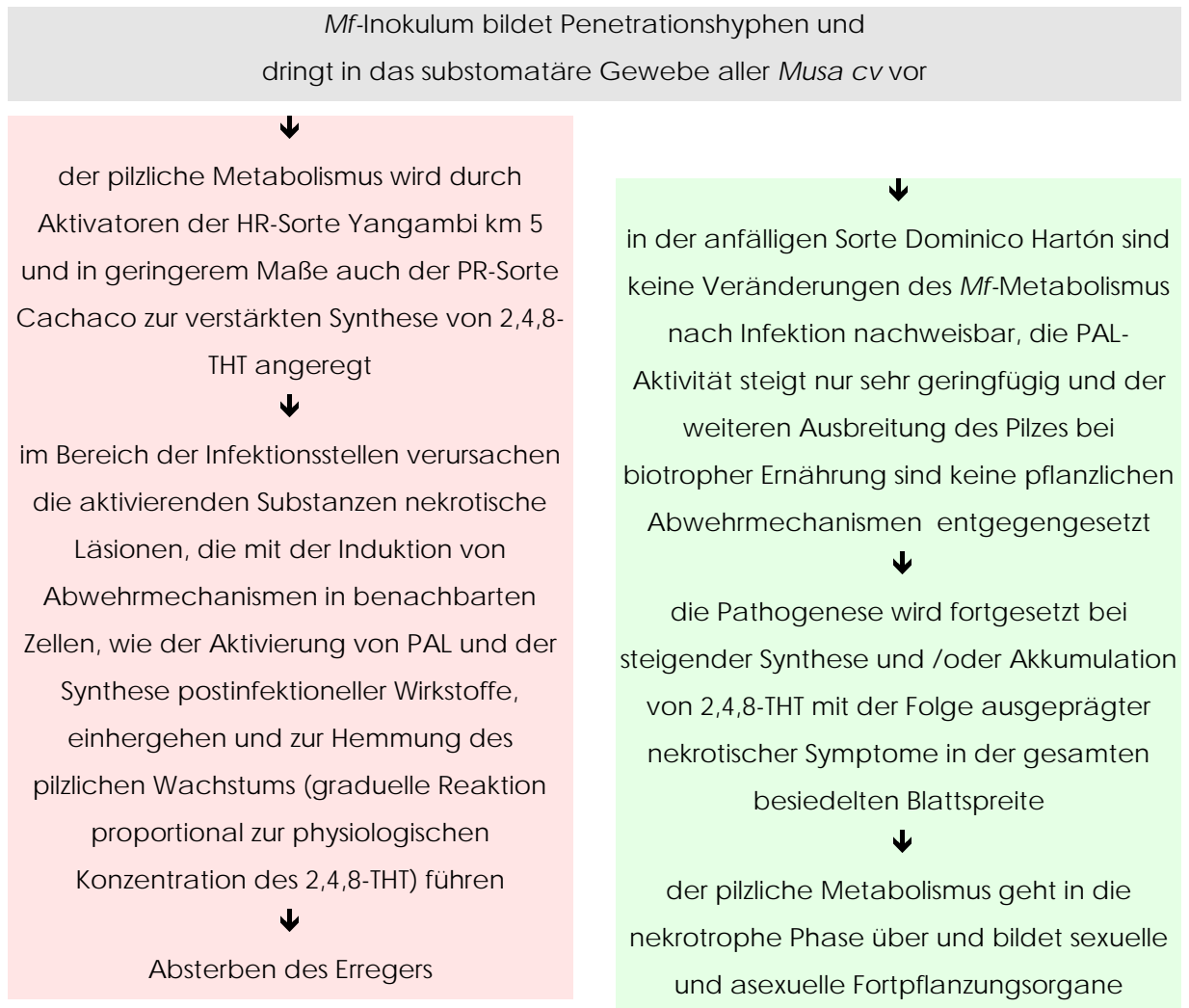
Die Fähigkeit des Erregers zur **Pathogenität** und der Entwicklung einer kompatiblen Wirt-Pathogeninteraktion entscheidet sich in der ersten Phase der Infektion: *Mf* ist in der Lage, *Musa* zu besiedeln, ohne 2,4,8-THT in toxischen Dosen zu produzieren und in physiologisch relevanten Konzentrationen im Apoplasten wirksam zu werden. Die Abwehr von *Mf* durch *Musa* cv Yangambi km 5 wird durch Mechanismen hervorgerufen, die durch die HR und weitere postinfektionelle Abwehrmechanismen zur Hemmung und Verhinderung des pilzlichen Wachstums im Frühstadium der Infektion führt und damit die Synthese von 2,4,8-THT verhindert.

Auf dieser Basis ist die Frage nach der Spezifität von *Mf*-Metaboliten gegenüber verschiedenen *Musa* cv neu zu formulieren: Beruht diese in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen nur in sehr geringem Maße auf einer *Musa* cv-spezifischen Sensitivität gegenüber 2,4,8-THT, so wird die Synthese dieser Substanz des pilzlichen Pentaketidmetabolismus aber in starkem Maße durch die Bananensorte beeinflusst. Die diesbezüglich festgestellte Förderung des 2,4,8-THT durch aktivierende Substanzen des Interzellularraumes der resistenten Sorten Cachaco (PR) und Yangambi km 5 (HR) weist auf eine spezifische Interaktion zwischen beiden Organismen hin: Diese wird durch eine sortenspezifische Beeinflussung des pathogenen Sekundärstoffwechsels einerseits und durch dessen Einwirkung auf die Pflanze andererseits charakterisiert, von deren quantitativem Ausmaß zu gegebenem Zeitpunkt die Entwicklung eines kompatiblen oder inkompatiblen Wirt-Pathogenverhältnisses bestimmt wird. Die im vorhergehenden Abschnitt formulierte Alternativhypothese zur Funktion des 2,4,8-THT läßt sich mit Verweis auf die eigenen Versuchsergebnisse folgendermaßen zusammenfassen:

- Erfolgt die nekrotische Wirkung des 2,4,8-THT unmittelbar nach der Penetration pflanzlichen Gewebes und geht mit der Aktivierung weiterer Abwehrmechanismen einher, entspricht die Funktion der eines **Elizitors**.

- Gelingt dem Pilz die Ausbreitung im pflanzlichen Gewebe ohne hinreichende Induktion von Wirtsreaktionen, so kommt es während der biotrophen Phase der Interaktion nur zu subletalen Einwirkungen des 2,4,8-THT, die nach LAZAROVITS und HIGGINS (1979) die Nährstoffversorgung des Pilzmyzels verbessern können; erst im weiteren Verlauf der Pathogenese liegt 2,4,8-THT in physiologisch wirksamen Konzentrationen vor, die zu ausgeprägter Symptomentwicklung und dem Übergang in die nekrotrophe Phase des kompatiblen Wirt-Pathogenverhältnisses führen. In dieser Phase entspricht die Funktion des 2,4,8-THT der eines **Toxins**.

Anknüpfend an die Arbeiten von BAILEY (1983, 1991) und BAILEY und O'CONNELL (1989) im Pathosystem Buschbohne/*Colletotrichum lindemuthianum* lassen sich die eigenen Versuchsergebnisse in folgenden chronologischen und inhaltlichen Zusammenhang bringen:



Der solchermaßen postulierte Verlauf der Interaktionen zwischen *Mf* und *Musa cv* führt also je nach physiologisch wirksamer Konzentration des 2,4,8-THT zu einer Nekrotisierung von Pflanzengewebe, deren Bildungsgeschwindigkeit und Ausmaß über das Wirt-Pathogenverhältnis hinsichtlich der Inkompatibilität oder Kompatibilität entscheidet. Diese Art der Interaktion ist auch von LAZAROVITS und HIGGINS (1979) im Pathosystem Tomate/*Cladosporium fulvum* untersucht worden, in dem subletale Konzentrationen des Toxins in der Pflanze als Folge einer Abwehrreaktion durch resistente Sorten zu toxischen Dosen gesteigert wurden. Im Falle der vorliegenden Interaktion zwischen *Musa sp* und *Mf* erlaubt die hemibiotrophe Lebensweise des Erregers die Bestimmung verschiedener Funktionen eines pilzlichen Sekundärstoffes, namentlich als Elizitor gegenüber heterologen *Musa cv* in der frühen Phase der Inkompatibilität sowie als Toxin im Rang eines Virulenzfaktors gegenüber homologen Wirtspflanzen in der nekrotrophen Phase des kompatiblen Pathosystems. Inwieweit die genetische Grundlage dieser biochemischen und physiologischen Interaktionen von dem AVR/avr-Genlocus (dominante Avirulenz, rezessive Pathogenität) kodiert wird und damit der Elizitor bzw. das Toxin als AVR-Produkt (GABRIEL 1989) angesehen werden kann, ist mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestimmbar. Bezüglich ihrer Funktion entspricht die Wirkung von 2,4,8-THT in der Initialphase der eines Elizitors: Nach BAILEY und O'CONNELL (1989) sind

toxische Effekte in kleinräumigem Maßstab als elizitorische Wirkung zu bezeichnen, die zu Phytoalexinbildung und der Ausprägung resistenter Interaktionen führt.

In diesem Zusammenhang soll auf das von GABRIEL und ROLFE (1990) entwickelte Modellsystem der pflanzlichen Ionenkanal-Abwehr verwiesen werden, das das Vorhandensein verschiedener Membranrezeptoren als Produkte der Resistenzgene postuliert. Diese Rezeptoren interagieren mit den als toxisch bezeichneten Produkten der pilzlichen AVR-Gene und induzieren einen Elektrolyt- (insbesondere Kalzium-) Flux in die Pflanzenzelle, der weitere aktive Abwehrreaktionen hervorruft. Das Modell ist in der Lage, die dosisabhängige Wirkung von Resistenzgenen, die auch für *Musa sp* postuliert worden ist (ORTIZ und VUYLSTEKE 1994, ORTIZ 1995), mit der Anzahl von Rezeptorzellen zu erklären, und geht von der Wirksamkeit einer sich ausbreitenden („spreading“) HR in der Pflanze aus, deren Ausmaß zu der Wirkung von Elizitoren einerseits und Rezeptoren andererseits proportional ist.

Folgende Abbildung faßt die Versuchselemente synoptisch zusammen, wobei die versuchsbedingte Einteilung in die drei Referenzsorten Yangambi km 5, Cachaco und Dominico Hartón als Beispiele für mögliche Reaktionen gegenüber *Mf* auf einem Kontinuum möglicher Reaktionen zwischen Resistenz und Anfälligkeit steht:

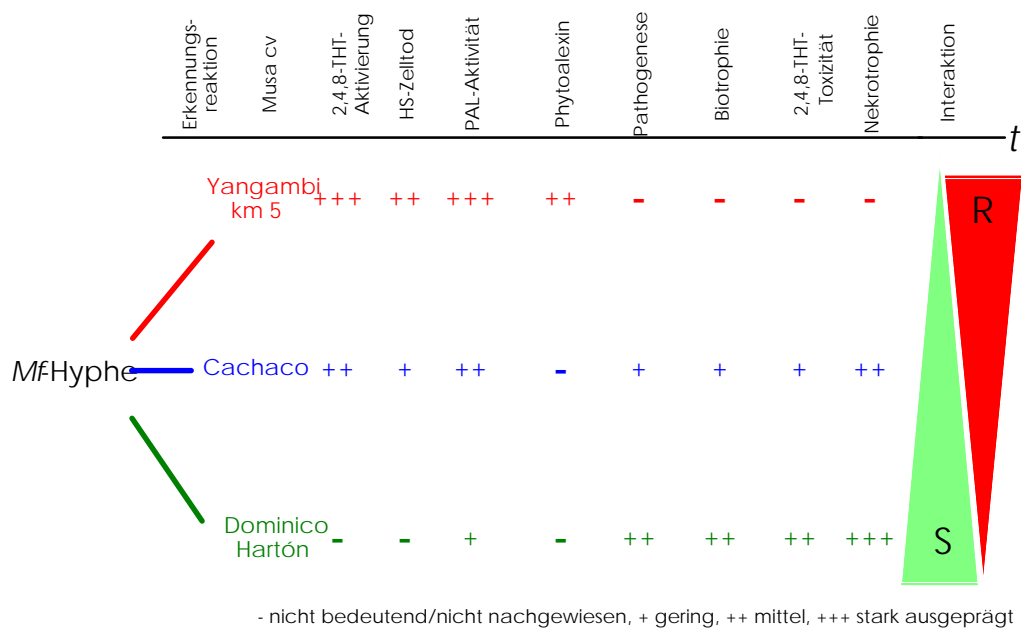


Abb. 43 Synoptische Darstellung der zeitlichen Abfolge biochemischer und physiologischer Interaktionen von *Mf* und dessen Metaboliten 2,4,8-THT mit verschiedenen *Musa cv*

Dabei ist zu betonen, daß die einzelnen Elemente der Darstellung auf Ergebnissen aus den *in vitro*- und *in vivo*-Versuchssystemen der vorliegenden Arbeit beruhen, die Anordnung in der angenommenen Reihenfolge aber nur hypothetisch unter Zuhilfenahme von Ergebnissen aus anderen Wirt-Pathogenverhältnissen erfolgen kann. Dies gilt in besonderem Maße für die aus

den *Mf*-Inkubationsversuchen unter *in vitro*-Bedingungen abgeleiteten Konzentrationen von 2,4,8-THT und dessen Wirkungen zu verschiedenen Zeitpunkten im natürlichen Pathosystem, aus dem eine Extraktion und Bestimmung pilzlicher Sekundärstoffe aus methodischen Gründen kaum durchführbar ist (YODER 1981). Im Falle der erwähnten Untersuchungen spezifischer Toxine bzw. Elizitoren des Pathogens bei Tomate/*Cladosporium fulvum* (DE WIT et al 1993a) ist zu betonen, daß das Produkt des pilzlichen Avirulenzgenes (*AVR9*) nur in der befallenen Pflanze, nicht aber in der pilzlichen Zellsuspension nachgewiesen worden ist, so daß der Wirtsorganismus für die Induktion des Pilzelizitors mitverantwortlich sein muß (ELSTNER et al 1996).

5.4 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die in der Einleitung formulierte Fragestellung bezüglich der postulierten Funktion ausgewählter *Mf*-Sekundärmetaboliten als wirtsspezifische Toxine (HST) läßt sich im Anschluß an die in der Diskussion vorgenommene alternative Interpretation der vorliegenden Ergebnisse folgendermaßen beantworten:

- Die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen ist als spezifische Beeinflussung des pilzlichen Sekundärstoffwechsel durch präinfektionelle Aktivatoren des pflanzlichen Interzellularraumes zu charakterisieren.
- Diese führt in resistenten *Musa cv* zu einer verstärkten Synthese von 2,4,8-THT durch das Pathogen und zur Induktion postinfektioneller Abwehrmechanismen im Zusammenhang mit der HR.
- 2,4,8-THT erfüllt in inkompatiblen *Musa sp/Mf*-Verhältnissen demnach die Funktion eines Elizitors weiterer pflanzlicher Reaktionen.
- In anfälligen *Musa cv* entspricht die Funktion des 2,4,8-THT der eines Virulenzfaktors in der nekrotrophen Phase der kompatiblen Interaktion *Musa sp/Mf* und wirkt damit als Toxin mit begrenzter Spezifität.

Eine weiterführende Zielsetzung der Bestimmung von Resistenzfaktoren der Wirtspflanze einerseits sowie von Pathogenitätsfaktoren des Erregers andererseits erfordert eine Überprüfung der hier formulierten Hypothese über die möglichen Funktionen des 2,4,8-THT in verschiedenen Interaktion mit *Musa cv* durch die Einbeziehung weiterer Sorten der Wirtspflanze und Isolate des Erregers.

Bezüglich der Wirtspflanze *Musa sp* ist in diesem Zusammenhang die Identifizierung der pflanzlichen Aktivatoren, die zu einer Beeinflussung der pilzlichen Synthese von 2,4,8-THT in resistenten Sorten beitragen, von Bedeutung. Außerdem sind die kausalen Beziehungen zwischen der HR und der Induktion weiterer Abwehrmechanismen wie der Aktivierung von PAL und der Synthese fungizider Sekundärmetaboliten zu untersuchen: Das von BAILEY (1989) angewandte Verfahren zur Immunlokalisierung mit Hilfe von PAL-Antikörpern erlaubt in der frü-

hen Phase der Wirt-Pathogeninteraktion eine kleinräumige Lokalisierung von nekrotischen und PAL-aktivierten Zellen im Bereich der Infektionshyphen. Im Hinblick auf die Bedeutung von Phytoalexinen liegen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen vor (MOURICHON et al 1990, LUIS et al 1993, 1996, vorliegende Arbeit), deren Zusammenführung zur Bestimmung von Struktur und Funktion phytoalexiner Substanzen und der Identifizierung von deren Biosynthesewegen im pflanzlichen Stoffwechsel führen könnte. Die Nutzung von Zellsuspensionen und Kalluskulturen der Wirtspflanze ist in diesem Zusammenhang erfolgversprechend, ist aber von weiteren Fortschritten in der *in vitro*-Kulturtechnik verschiedener *Musa cv* und der Etablierung von Referenzsorten zur weiteren experimentellen Untersuchung abhängig.

Seitens des Erregerorganismus *Mf* ist der in der vorliegenden Arbeit mit Erfolg angewendete Wirkstoff Tricyclazol[®] zur weiteren Untersuchung der biochemischen Regulierung des pilzlichen 2,4,8-THT nutzbar; in Verbindung mit genbiologischen Methoden (CARLIER et al 1993, 1994) ist eine Identifizierung der die Pathogenität bzw. Avirulenz kodierenden Abschnitte des Erregers möglich.

In diesem Zusammenhang hat das von der Arbeitsgruppe um De Wit untersuchte Wirt-Pathogenverhältnis Tomate/*Cladosporium fulvum* den Status eines Referenzsystems errungen, da erstmals die Isolierung eines die pilzliche Avirulenz kodierenden Genes (*AVR9*) gelungen ist (DE WIT et al 1993a), mit dessen Produkt die Identifizierung des korrespondierenden Resistenzgenes in der Pflanze (*Cf9*) erfolgte (ELSTNER et al 1996). Diesbezüglich wird über die Ausnutzung der phänotypisch als „zerstörerische HR“ auftretenden Form der pflanzlichen Abwehr durch einen Transfer beider Gene als Zweikomponentensystem (CORNELISSEN und MELCHERS 1993) in den Wirtsorganismus diskutiert und eine Regulierung von deren Expression zur Steuerung durch angreifende Pathogene angestrebt: Das die HR induzierende Gen darf dabei nicht konstitutiv exprimiert werden, sondern muß durch einen Promotor aktiviert werden, der die Reaktion lokal und zeitlich begrenzt (DE WIT et al 1993a). Die Induktion kann sowohl durch spezifische als auch durch unspezifische Erreger ausgelöst werden (CORNELISSEN und MELCHERS 1993, ELSTNER et al 1996).

Die praktische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse im Pathosystem *Musa sp/Mf* für weitere Untersuchungen ist in der Bestimmung natürlicher Resistenzmechanismen in der Wirtspflanze *Musa sp* zu sehen, deren Ausnutzung zu einer bevorzugten Methode eines zeitgemäßen Pflanzenschutzes angesehen wird. Dabei sind folgende Möglichkeiten einer Anwendung natürlicher Resistenzphänomene gegeben (ELSTNER et al 1996):

- Induktion von Resistenzmechanismen durch therapeutische Anwendung natürlicher oder synthetischer Wirkstoffe (z. B. 2,4,8-THT);
- Anwendung klassischer Züchtungsverfahren zur Rekombination von Sorten mit konstitutiven oder induktiven Resistenzfaktoren (Nutzung fertiler, resistenter Diploide aus *Musa acuminata*);

- Transgenetische Synthese von Nutzpflanzen mit mehreren Komponenten zur gezielten Expression von Resistenzmechanismen unter Einschluß interspezifischer Rekombination (Avirulenzgene des Erregers werden in das pflanzliche Genom transferiert).

Die botanischen Charakteristika von *Musa sp* haben einerseits die Anwendung konventioneller Züchtungsmethoden weitgehend verhindert, ermöglichen andererseits aber die Konservierung der erreichten Fortschritte in der genetischen Verbesserung erwünschter Eigenschaften. Die durch die Arbeiten von SAGI et al (1994, 1995) entwickelte Methode einer genetischen Transformation von *Musa sp* erlaubt eine Ausweitung der Perspektiven intra- und interspezifischen Gentransfers und somit eine Nutzung spezifischer Abwehrreaktionen als Alternative zu chemotherapeutischen Verfahren.

Die Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pathosystems *Musa sp/Mf* könnten diesbezüglich zur Identifizierung von Avirulenzgenen des Erregers und deren korrespondierender Resistenzgene beitragen und eine Nutzung von Abwehrreaktionen in der Wirtspflanze ermöglichen.

6 Zusammenfassungen

6.1 Zusammenfassung (dt.)

HOß R (1998) **Untersuchungen zur Funktion und Spezifität pilzlicher Sekundärmetaboliten im Pathosystem „Schwarze Sigatokakrankheit“ der Banane (*Musa sp* - *Mycosphaerella fijiensis*).** Diss., Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin und Angewandte Entomologie, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin.
Zus. Schlüsselbegriffe: Pathogenität, wirtsspezifische Toxine, 2,4,8-Trihydroxytetralon, Elizitor.

Der pilzliche Erreger der Schwarzen Sigatokakrankheit, *Mycosphaerella fijiensis* (Mf), befällt fast alle Sorten (cv) der angebauten Banane *Musa sp*. Dabei sind weder die Reaktionen der Wirtspflanzen gegenüber dem Pathogen noch dessen Pathogenität hinreichend charakterisiert. Eine besondere Bedeutung wurde für pilzliche Sekundärmetaboliten des Pentaketid-Biosyntheseweges als spezifische Toxine innerhalb des Pathosystems postuliert.

Die vorliegende Arbeit hat die experimentelle Untersuchung der Wirt-Pathogeninteraktionen zur Zielsetzung und wendet Methoden der Gewebekultur und Chromatographie zur biochemischen und physiologischen Charakterisierung des pflanzlichen und pilzlichen Stoffwechsels an.

Bezüglich der pflanzlichen Abwehrmechanismen von resistenten *Musa cv* konnte eine hypersensitive Reaktion (HR), die Aktivierung des Enzyms PAL und die Anreicherung von postinfektionellen Substanzen zur Hemmung des Pilzwachstums nachgewiesen werden. Im Erregermetabolismus wurden unter *in vitro*-Bedingungen die Pentaketide Flaviolin, 2-Hydroxyjuglon, Juglon und 2,4,8-Trihydroxytetralon (-THT) bestimmt. Die Konzentration an 2,4,8-THT konnte sowohl durch die Anwendung des synthetischen Wirkstoffes Tricyclazol® sowie durch natürliche Aktivatoren aus interzellulärem Blattgewebe resistenter *Musa cv* stark gesteigert werden. Mf-Rohextrakte und ausgewählte pilzliche Substanzen wurden auf ihre Dosis-Wirkungsbeziehung gegenüber verschiedenen *Musa cv* untersucht. Unter *in vivo*-Bedingungen Mf-inokulierter Bananenpflanzen führte die Anwendung des Wirkstoffes zu einer als „zerstörerische HR“ bezeichneten Nekrotisierung des Blattes in anfälligen und resistenten Sorten.

Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung des 2,4,8-THT für die Ausprägung nekrotischer Blattsymptome, die in Abhängigkeit von der Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt *Musa cv*-spezifische Wirkungen hervorruft: In der resistenten Sorte führte die Steigerung von 2,4,8-THT zur HR und der Elizitierung postinfektioneller Abwehrreaktionen, die zur Inkompatibilität zwischen Pathogen und Wirtspflanze führen; in der anfälligen Sorte erreicht 2,4,8-THT erst nach Ausbildung einer kompatiblen Interaktion mit biotropher Ernährung toxische Dosen und wirkt als Virulenzfaktor in der nekrotrophen Phase der Pathogenese.

6.2 Abstract (engl.)

Hoss R (1998) **Studies on function and specificity of fungal secondary metabolites in the Black Sigatoka disease pathosystem of banana and plantain (*Musa sp* - *Mycosphaerella fijiensis*).**

Ph D Thesis at Humboldt University of Berlin, Faculty of Agriculture and Horticulture, Phytomedicine and Applied Entomology Section, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Germany.

Add. key words: Pathogenicity, host-specific toxins, 2,4,8-trihydroxytetralone, elicitor.

The fungal pathogen causing black Sigatoka disease, *Mycosphaerella fijiensis* (Mf), attacks almost all varieties (cv) of cultivated bananas and plantains *Musa sp*. However, neither the reactions of host plant in relation to the pathogen nor its pathogenicity has been characterized in detail. A special significance has been attributed to fungal secondary metabolites of pentaketid pathway as host-specific toxins within the pathosystem.

The present study refers to the experimental investigation of host-pathogen interactions using tissue culture as well as chromatographic methods in order to characterize biochemical and physiological metabolisms of plant and fungus.

With reference to plant defense mechanisms of resistant *Musa cv*, hypersensitive reaction (HR), activation of phenylalanine-ammonia lyase and accumulation of postinfectious substances which blocked fungal growth have been demonstrated. Using *in vitro* conditions, the pentaketide metabolites flaviolin, 2-hydroxyjuglone, juglone and 2,4,8-trihydroxytetralone (2,4,8-tht) had been determined. 2,4,8-tht concentration was significantly increased through the application of the synthetic compound tricyclazole® and through natural activators extracted from resistant *Musa cv* intercellular space of leaf tissue. Dose-effect relationship between crude extracts and selected fungal substances applied to different *Musa cv* were investigated. Using *in vivo* conditions, the application of tricyclazole® to host plants inoculated with Mf resulted in extensive necrosis of susceptible and resistant *Musa cv* leaves, characterized as „devastating HR“.

These results proof the importance of 2,4,8-tht for the development of necrotic leaf symptoms that causes host-specific reactions depending on their concentration at different moments of pathogenesis: The resistant *Musa* variety increases 2,4,8-tht causing HR and elicitation of postinfectious defense reactions that lead to incompatibility between pathogen and host plant; in the susceptible variety, 2,4,8-tht attains toxic doses only after establishment of a compatible interaction including biotrophic nutrition of the pathogen, acting as a virulence factor during the necrotrophic phase of pathogenesis.

6.3 Resumen (span.)

Hoss R (1998) **Investigaciones acerca de la función y la especificidad de sustancias metabólicas secundarias de hongos, en el patosistema de la Sigatoka Negra de banano y plátano (*Musa sp* - *Mycosphaerella fijiensis*).**

Ph D Tesis, Universidad de Humboldt, Facultad de Agricultura y Horticultura, Sección de Sanidad Vegetal y Entomología Aplicada, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Alemania.

Palabras claves adic.: Patogénesis, toxinas específicas, 2,4,8-trihidróxido de tetralón, elicitor.

El hongo patogénico causante de la Sigatoka Negra, *Mycosphaerella fijiensis* (Mf), ataca casi todas las variedades (cv) del banano y del plátano cultivados *Musa sp*. Por otro lado no se han caracterizado suficientemente ni las reacciones de la planta hospedera frente al patógeno ni cuya patogenicidad al atacar. Una importancia especial se ha atribuido a las sustancias metabólicas secundarias del hongo sintetizadas en el metabolismo de policétidos, asignándolas una función de toxinas específicas dentro del patosistema.

El estudio realizado pretende investigar de manera experimental las interacciones entre la planta hospedera y el patógeno, usando métodos de cultivo de tejido y la cromatografía para caracterizar bioquímica y fisiológicamente el metabolismo de la planta y del hongo.

Referente a los mecanismos de defensa de las plantas resistentes de *Musa cv*, se ha podido demostrar una reacción hipersensitiva (RH), la activación del enzima fenilalanina-amonioliasa y la acumulación de sustancias posinfeccionales inhibiendo el crecimiento de fungi. Bajo condiciones de *in vitro*, se han detectado las sustancias metabólicas flaviolín, 2-hidróxido de juglón, juglón y 2,4,8-trihidróxido de tetralón (2,4,8-tht) en el organismo patogénico. La concentración de 2,4,8-tht ha aumentado significativamente por la aplicación de la sustancia sintética Triciclazol® y de sustancias activadoras extraídas del espacio intercelular del tejido foliar de variedades resistentes. Se han investigado las relaciones dosis-efecto de los extractos crudos y sustancias seleccionadas del hongo aplicado a diferentes *Musa cv*. Bajo condiciones de *in vivo*, la aplicación de la sustancia Triciclazol® al tejido foliar de bananos y plátanos inoculados con Mf resultó en la necrotización extensiva de las hojas de variedades susceptibles y resistentes, denominado como „RH destructivo“.

Estos resultados confirman la importancia del 2,4,8-tht para la expresión de los síntomas necróticos foliares, cuyos efectos específicos dependen de la concentración en determinados momentos de la patogénesis: La variedad resistente incrementa 2,4,8-tht causando RH y la elicitación de reacciones posinfeccionales de defensa que llevan a la incompatibilidad entre patógeno y planta hospedera; en la variedad susceptible, 2,4,8-tht alcanza niveles tóxicos sólo después de haber establecido interacciones compatibles con nutrición biotrófica, actuando como factor de virulencia en la fase necrotrófica de la patogénesis.

7 Literatur

- AGRIOS GN (1988) Plant Pathology. 3. Aufl, Academic Press, Inc: San Diego, 803 pp.
- ATKINSON MM (1993) Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. **Adv Pl Pathol** 10: 35-64.
- BAILEY JA (1983) Biological perspectives of host-pathogen interactions. In: Bailey JA, Deverall BJ (eds) **The Dynamics of Host Defence**, Ch 1, Academic Press: Sydney, pp. 1-32.
- BAILEY JA (1991) Recognition events associated with specific interactions between plants and pathogenic fungi. In: Smith CJ (ed) **Biochemistry and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**, Ch 13, Clarendon Press: Oxford, pp. 210-24.
- BAILEY JA, O'CONNELL RJ (1989) Plant cell death: a determinant of disease resistance and susceptibility. In: Graniti A, Durbin RD, Ballio A (eds) **Phytotoxins and Plant Pathogenesis**, Springer Verlag: Berlin, pp. 275-84.
- BAKER DA, KALLARACKAL J, MILBURN JA (1990) Water relations of the banana. II. Physiochemical aspects of the latex and other tissue fluids. **Austral J Pl Physiol** 17: 69-77.
- BANERJEE N, DE LANGHE E (1985) A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Pl Cell Reports** 4: 351-4.
- BEIßMANN B, KOGEL KH (1992) Identification and characterization of suppressors. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) **Plant Toxin Analysis**, Springer Verlag: Heidelberg, pp. 259-75.
- BELL AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annu Rev Pl Physiol** 32: 21-81.
- BELL AA, STIPANOVIC RD, PUHALLA JE (1976) Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*: Identification of (+)-scytalone as a natural precursor to melanin. **Tetrahedron** 32: 1353-6.
- BEVERAGGI A, MOURICHON X, SALLÉ G (1993) Study of host-parasite interactions in susceptible and resistant bananas inoculated with *Cercospora fijiensis*, pathogen of black leaf streak disease. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 171-92.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem** 72: 248-54.
- BRAZOLOT J, YU KF, PAULS PK (1994) *In vitro* selection for disease/toxin resistance. In: Dixon RA, Gonzales RA (eds) **Plant Cell Culture. A Practical Approach**, Ch 4D, IRL Press: Oxford, pp. 87-97.
- BROOKS CJW, WATSON DG (1991) Terpenoid phytoalexins. **Nat Prod Rep** 8: 367-89.
- BUDDENHAGEN IW (1993) Whence and whither banana research and development? In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 12-26.
- BUCHENAUER H (1990) Physiological reactions in the inhibition of plant pathogenic fungi. In: Bowers WS, Ebing W, Martin D, Wegler R (eds) **Controlled Release, Biochemical Effects of Pesticides, Inhibition of Plant Pathogenic Fungi**. Springer Verlag: Berlin, pp. 217-92.
- BUIATTI M, INGRAM DS (1991) Phytotoxins as tools in breeding and selection of disease-resistant plants. **Experientia** 47: 811-9.
- CARLIER J, GONZÁLEZ DE LEÓN D, MOURICHON X, ZAPATER MF (1993) Genetic diversity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak in banana. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 193-9.
- CARLIER J, MOURICHON X, GONZÁLEZ DE LEÓN D, ZAPATER MF, LEBRUN MH (1994) DNA RFLP in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. **Phytopathol** 84: 751-6.

- CLARKSON JM (1992) Fungi. In: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ (eds) **Molecular Plant Pathology**, Vol 1, Ch 7, IRL Press at Oxford University Press: Oxford, pp. 67-77.
- COLLINGE DB, GREGERSEN PL, THORDAL-CHRISTENSEN H (1994) The induction of the gene expression in response to pathogenic microbes. In: Basra AS (ed) **Mechanisms of plant growth and improved productivity**, Ch 11, Marcel Dekker Inc: New York, pp. 391-433.
- CORNELLISSSEN BJC, MELCHERS LS (1993) Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **PI Physiol** 101:: 709-12
- CRAENEN K, ORTIZ R (1996) Effect of the black Sigatoka resistance locus *bs1* and ploidy level on fruit and bunch traits of plantain-banana hybrids. **Euphytica** 87: 97-101.
- CRONAUER S, KRIKORIAN AD (1983) Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa* "ABB"). **PI Cell Rep** 2: 289-91.
- CRONSHAW DK, AKERS A (1990) Mode of action of Tridemorph and sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Bananas**, INIBAP: Montpellier, pp. 84-9.
- DALY JM (1987) Toxins as determinants in plant diseases. In: Nishimura S, Vance P, Doke N (eds) **Molecular Determinants of Plant Diseases**, Japan Scientific Society Press/Springer Verlag: Tokyo/Berlin, pp. 119-24.
- DALY JM, KNOCH HW (1982) The chemistry and biology of pathotoxins exhibiting host-selectivity. **Adv PI Pathol** 1: 83-138.
- DE WIT PJGM (1986) Elicitation of active resistance mechanisms. In: Bailey J (ed) **Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**, Springer Verlag: Berlin, pp. 149-69.
- DE WIT PJGM, SPIKMAN G (1982) Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. **Physiol PI Pathol** 21: 1-11.
- DE WIT PJGM, TOMA IMJ (1986) Occurrence of race-specific elicitors in the host pathogen interaction tomato-*Cladosporium fulvum*. In: Lugtenberg B (ed) **Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions**, Springer Verlag: Berlin, pp. 287-95.
- DE WIT PJGM, VAN DEN ACKERVEKEN GFJM, VOSSEN PMJ, JOOSTEN MAHJ, COZIJSSEN TJ, HONEE G, WUBBEN JP, DANHASH N, VAN KAN JAL, MARMEISSE R, VAN DEN BROEK HWJ (1993a) Avirulence genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* and their exploitation in molecular breeding for disease-resistant plants. In: Fritig G, Legrand M (eds) **Mechanisms of plant defense response**, Kluwer Academic Press: Dordrecht, pp. 24-32.
- DE WIT PJGM, VAN DEN ACKERVEKEN GFJM, VOSSEN PMJ, JOOSTEN MAHJ, COZIJSSEN TJ, HONEE G, WUBBEN JP, DANHASH N, VAN KAN JAL, MARMEISSE R, VAN DEN BROEK HWJ (1993b) Molecular cloning and functions of avirulence and pathogenicity genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. In: Nester EW, Verma DPS (eds) **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, pp. 289-98.
- DHED`A D, DUMORTIER F, PANIS B, VUYLSTEKE D, DE LANGHE E (1991) Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. „Bluggoe“ (*Musa spp.* ABB group). **Fruits** 46: 125-35.
- DIXON RA (1986) The phytoalexin response: elicitation, signalling, and control of host gene expression. **Biol Rev** 61: 239-91.
- DIXON RA, LAMB CJ (1990) Regulation of secondary metabolism at the biochemical and genetic level. In: Charlwood BV, Rhodes MJC (eds) **Secondary Products from Plant Tissue Culture**, Ch 6, Clarendon Press: Oxford, pp. 103-18.
- DOKE N, TOMIYAMA K, FURUICHI N (1982) Elicitation and suppression of the hypersensitive response in host-parasite specificity. In: Asada Y, Bushnell WR, Ouchi S, Vance CP (eds) **Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis**, Japan Scientific Society Press/Springer Verlag: Tokyo/Berlin, pp. 79-96.

- DONOVAN A, ISAAC S, COLLIN HA (1990) Dual fungal and plant cell culture. In: Pollard JW, Walker JM (eds) **Plant Cell and Tissue Culture**, Ch 37, Humana Press Inc: Clifton, pp. 405-12.
- DURBIN RD (1983) The biochemistry of fungal and bacterial toxins and their modes of action. In: Callow JA (ed) **Biochemical plant pathology**, Ch 8, John Wiley and Sons Ltd: Chichester, pp. 137-62.
- EBEL J, SCHEEL D (1992) Elicitor recognition and signal transduction. In: Troller T, Meins F (eds) **Genes Involved in Plant Defense**, Ch 8, Springer Verlag: Wien, pp. 183-205.
- EDWARDS R, KESSMANN H (1992) Isoflavonoid phytoalexins and their biosynthetic enzymes. In: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ (eds) **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach, Vol 2**, Ch 6, IRL Press at Oxford University Press: Oxford, pp. 45-62.
- ELLINGBOE AH (1976) Genetics of host-parasite interactions. In: Heitefuss R, Williams RH (eds) **Physiological Plant Pathology**, Ch 8, Springer Verlag: Berlin, pp. 761-78.
- ELSTNER EF, OBWALD W, SCHNEIDER I (1996) Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum, Akademieverlag: Heidelberg, 328 pp.
- ESCALANT JV, TEISSON C (1993) Somatic embryogenesis and cell suspensions in *Musa*. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 177-180.
- FLOR HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. **Annu Rev Phytopathol** 9: 275-96.
- FOURÉ E (1993) Characterization of the reactions of banana cultivars to *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Cameroon and genetics of resistance. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp.159
- FOURÉ E, MOULIOM-PEFOURA A, MOURICHON X (1990) Etude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétiques. **Fruits** 45: 339-45.
- FOURÉ E, TOMEKPE K (1996) Banana varietal susceptibility and genetic basis of resistance to black sigatoka. **MusAfrica** 10 (IITA): 21-2.
- FRANK SA (1992) Models of plant-pathogen coevolution. **Trends in Gen** 8: 213-9.
- FREYTAG S, HAHNBROCK K (1992) Abwehrreaktionen von Pflanzen gegen Pilzbefall. **Biol in unserer Zeit** 22: 135-42.
- FULLERTON RA (1990) Studies on *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in the Pacific Islands. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 29-37.
- FULLERTON RA, OLSEN TL (1991) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. In: Valmayor RV, Umali BE, Bejosano CP (eds) **Banana Diseases in Asia and the Pacific**, INIBAP: Montpellier, pp. 105-14.
- FULLERTON RA, OLSEN TL (1995) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. **New Zealand J Crop Hortic Sci** 23: 39-48.
- GABRIEL DW (1989) Genetics of plant parasite populations and host-parasite specificity. In: Kosuge T, Nester EW (eds) **Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives**, Ch 11, Mc Graw-Hill Publishing Co: New York, pp. 343-79.
- GABRIEL DW, ROLFE BG (1990) Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annu Rev Phytopathol** 28: 365-91.
- GALUN E, BREIMAN A (1992) Quantitative assays of phytotoxins using plant protoplasts and isolated cells. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) **Plant Toxin Analysis**, Springer Verlag: Heidelberg, pp. 33-50.
- GAUHL F, PASBERG-GAUHL C, EKANAYAKE IJ (1995) Carbohydrate content in *Musa* leaves and host response to black Sigatoka. **Mitteilungen der DPG** 4/1995: 47

- GONZÁLEZ DE LEÓN D, FAURÉ S (1993) Genetic mapping of the banana diploid genome: toward an integrated approach to the study of the *Musa* genome and the use of molecular marker technologies in *Musa* breeding. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 29-46.
- GRANITI A (1991) Phytotoxins and their involvement in plant diseases. Introduction. **Experientia** 47: 751-5.
- GREENBLATT GA, WHEELER MH (1986) HPLC analysis of fungal melanin intermediates and related metabolites. **J Liq Chromatog** 9: 971-81.
- HAHLBROCK K (1988) Programmierter Zelltod bei der Abwehr von Pflanzen gegen Krankheitserreger. Westdeutscher Verlag: Opladen, 21 pp.
- HAN F, KLEINHOF A, KIULIAN A, ULLRICH SE (1997) Cloning and mapping of a putative barley NADPH-dependent HC-toxin reductase. **Mol Plant-Microbe Interactions** 10 (2): 234-9.
- HEATH MC (1981) A generalized concept of host-parasite specificity. **Phytopathol** 71: 1121-3.
- HEß D (1970) Pflanzenphysiologie. Molekulare und biochemisch-physiologische Grundlage von Stoffwechsel und Entwicklung. Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, 368 pp.
- HOFFMANN GM, NIENHAUS F, POEHLING HM, SCHÖNBECK F, WELTZIEN HC, WILBERT H (1994) Lehrbuch der Phytomedizin. Blackwell Wissenschaftsverlag: Berlin, 542 pp.
- INIBAP (1997) Passport accession descriptors (Pers. Mttlg.).
- ISRAELI Y, LAHAV E, REUVENI O (1995) *In vitro* culture of bananas. In: Gowen S (ed) **Bananas and Plantains**, Ch 6, Chapman and Hall: London, pp. 148-78.
- JACOME LH, SCHUH W (1993) Effect of temperature on growth and conidial production *in vitro*, and comparison of infection and aggressiveness *in vivo* among isolates of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Trop Agric** 70: 51-9.
- JACOME LH, SCHUH W, STEVENSON RE (1991) Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathol** 81: 1480-5.
- JARRET RL, GAWEL N (1995) Molecular markers, genetic diversity and systematics in *Musa*. In: Gowen S (ed) **Bananas and Plantains**, Ch 3, Chapman and Hall: London, pp. 66-83.
- JAYAPAL R, MAHADEVAN A (1968) Biochemical changes in banana leaves in host response to leaf spot pathogens. **Indian Phytopathol** 21: 43-8.
- JEGER MJ, EDEN-GREEN S, THRESH JM, JOHANSON A, WALLER JM, BROWN AE (1995) Banana diseases. In: Gowen S (ed) **Bananas and Plantains**, Ch 11, Chapman and Hall: London, pp. 317-81.
- JOHNSON R, KNOTT DR (1992) Specificity in gene-for-gene interactions between plants and pathogens. **PI Pathol** 41: 1-4.
- JONES DR (1995) Rapid assessment of *Musa* for reaction to Sigatoka disease. **Fruits** 50: 11-22.
- JONES PW (1990) *In vitro* selection for disease resistance. In: Dix PJ (ed) **Plant Cell Line Selection**, Ch 5, Verlag Chemie: Weinheim, pp. 113-49.
- KAARS SIJPEIJN A (1976) Induction of hypersensitive response to fungal pathogens. In: Wood RKS, Graniti A (eds) **Specificity in Plant Disease**, Plenum Press: New York, pp. 273-85.
- KAWAMURA C, MORIWAKI J, KIMURA N, FUJITA Y, FUJI S, HIRANO T, KOIZUMI S, TSUGE T (1997) The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. **Mol Plant-Microbe Interactions** 10 (4): 446-53.
- KEEN NT (1978) Phytoalexins: efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. **Phytopathol** 68: 1237-9.
- KEEN NT (1982) Specific recognition in gene-for-gene host-parasite systems. **Adv Plant Pathol** 1: 35-82.

- KEEN NT (1986) Pathogenic strategies of fungi. In: Lugtenberg BJJ (ed) **Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interaction**, NATO ASI Serie H4, Springer-Verlag: Berlin, pp. 171-88.
- KEEN NT (1990) Gene-for gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annu Rev Genet** 24: 447-63.
- KEEN NT, DAWSON WO (1992) Pathogen avirulence genes and elicitors of plant defense. In: Troller T, Meins F (eds) **Genes Involved in Plant Defense**, Ch 4, Springer Verlag: Wien, pp. 85-114.
- KIRÁLY Z (1980) Defenses triggered by the invader: Hypersensitivity. In: Horsfall JG, Cowling EB (eds) **Plant Disease**, Vol V, Ch 11, Academic Press: New York, pp. 201-224.
- KOGEL KH, BEISSMANN B (1992) Isolation and characterization of elicitors. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) **Plant Toxin Analysis**, Springer Verlag: Heidelberg, pp. 239-57.
- KOHMOTO K, OTANI H (1991) Host recognition by toxigenic plant pathogens. **Experientia** 47: 755-64.
- KREISEL H, SCHAUER F (1987) Methoden des mykologischen Laboratoriums. VEB Gustav Fischer: Jena.
- LAZAROVITS G, HIGGINS VJ (1979) Biological activity and specificity of a toxin produced by *Cladosporium fulvum*. **Physiol Biochem** 69: 1056-61.
- LEGRAND M (1983) Phenylpropanoid metabolism and its regulation in disease. In: Callow JA (ed) **Biochemical Plant Pathology**, Ch 17, John Wiley and Sons Ltd: Chichester, pp. 367-84.
- LEIDREITER K (1995) Biochemische Untersuchungen an Kartoffelpflanzen mit gentechnisch veränderten Enzymaktivitäten im Saccharose- und Stärkemetabolismus. Diss., Universität Göttingen.
- LEPOIVRE P, ACUNA CP (1990) Production of toxins by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and induction of antimicrobial compounds in banana: their relevance in breeding for resistance to black Sigatoka. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 201-7.
- LEPOIVRE P, ACUNA CP, RIVEROS AS (1993) Screening Procedures for improving resistance to banana black leaf streak disease. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 213-20.
- LUIS JG, ECHEVERRI F, QUIÑONES W, BRITO I, LÓPEZ M, TORRES F, CARDONA G, AGUIAR Z, PELAEZ C, ROJAS M (1993) Irenolone and emenolone - two new types of phytoalexin from *Musa paradisiaca*. **J Org Chem** 58: 4306-8.
- LUIS JG, FLETCHER WQ, ECHEVERRI F, GRILLO TA (1994) Phenalenone-type phytoalexins from *Musa acuminata*. Synthesis of 4-Phenyl-phenalenones. **Tetrahedron** 37: 10963-70.
- LUIS JG, FLETCHER WQ, ECHEVERRI F, GRILLO TA, PERALES A, GONZÁLEZ JA (1995) Intermediates with biosynthetic implications in *de novo* production of phenyl-phenalenone-type phytoalexins by *Musa acuminata*. Revised structure of emenolone. **Tetrahedron** 14: 4117-30.
- LUIS JG, QUIÑONES W, ECHEVERRI F, GRILLO TA, KISHI MP, GARCÍA-GARCÍA F, TORRES F, CARDONA G (1996) Musanolones: Four 9-Phenylphenalenones from rhizomes of *Musa acuminata*. **Phytochemistry** 41: 753-7.
- MANSFIELD JW (1983) Antimicrobial compounds. In: Callow JA (ed) **Biochemical Plant Pathology**, John Wiley and Sons Ltd: Chichester, pp. 237-65.
- MANSFIELD JW (1986) Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. In: Lugtenberg B (ed) **Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions**, NATO ASI Serie H4, Springer Verlag: Heidelberg, pp. 433-7.
- MAYAMA S, TANI T, UENO T, MIDLAND SL, SIMS J, KEEN NT (1986) The purification of victorin and its phytoalexin elicitor activity in oat leaves. **Physiol Mol Pl Pathol** 29: 1-18.

- MEELEY RB, JOHAL GS, BRIGGS SP, WALTON JD (1992) A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. **The PI Cell** 4: 71-7.
- MEGIA R, HAICOUR R, ROSSIGNOL L, SIHACHAKR D (1992) Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa sp.*). **PI Sci** 85: 91-8.
- MEGIA R, HAICOUR R, TIZROUTINE S, BUI TRANG V, ROSSIGNOL L, SIHACHAKR D, SCHWENDIMAN J (1993) Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa sp.*, ABB group). **PI Cell Rep** 13: 41-4.
- MERCK (1996) The Merck Index. Whitehouse Station: New York, 1741 pp.
- Mohr H, Schopfer P (1992) Pflanzenphysiologie. 4. Aufl, Springer Verlag: Berlin, 660 pp.
- MOLINA GC, KRAUSZ JP (1989) A phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to Black Sigatoka. **PI Dis** 73: 142-4.
- MOULIOM-PEFOURA A, LASSOUDIÈRE A, FOKO J, FONTEM DA (1996) Comparison of development of *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola* on banana and plantain in the various ecological zones in Cameroon. **PI Dis** 80: 950-4.
- MOURICHON X, BEVERAGGI A, SALLÉ G (1990) Preformed substances as potential protectants to *Mycosphaerella fijiensis* in banana leaves: presence of preformed compounds toxic for *M. fijiensis*. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka leaf spot diseases of banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 172-9.
- MOURICHON X, FULLERTON RA (1990) Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. **Fruits** 45: 213-8.
- NATURAL MP (1990) An update on the development of an *in vitro* screening procedure for resistance to black Sigatoka leaf diseases of banana. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 208-30.
- NIKS RE (1988) Nonhost plant species as donors for resistance to pathogens with narrow host range. II. Concepts and evidence on the genetic basis of nonhost resistance. **Euphytica** 37: 89-99.
- NISHIMURA S, KOHMOTO K (1983) Roles of toxins in pathogenesis. In: Daly JM, Deverall BJ (eds) **Toxins and Plant Pathogenesis**, Ch 4, Academic Press Australia: Sydney, pp. 137-57.
- NOVACKY A (1983) The effects of disease on the structure and activity of membranes. In: Callow JA (ed) **Biochemical Plant Pathology**, Ch 16, John Wiley and Sons Ltd: Chichester, pp. 347-66.
- NOVAK FJ, AFZA R, VAN DUREN M, PEREA-DALLOS M, CONGER BV, TANG X (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa spp.*). **Bio/Technology** 7: 154-9.
- NOVAK FJ, BRUNNER H, AFZA R, MORPURGO R, UPADHYAY RK, VAN DUREN M, SACCHI M, SITI HAWA J, KHATRI A, KAHL G, KAEMMER D, RAMSER J, WEISING K (1993) Improvement of *Musa* through biotechnology and mutation breeding. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 143-58.
- OKOLE BN (1995) Selection of banana and plantain (*Musa spp.*) tissues resistant to toxins produced by *Mycosphaerella* species using tissue culture techniques. PhD Thesis Humboldt-Universität zu Berlin, 170 pp.
- OKOLE BN, SCHULZ FA (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. **Plant Cell Rep** 16: 339-43.
- OKU H (1992) Gene expression in susceptibility and resistance of fungal plant diseases. In: Verma DPS (ed) **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications**, CRC Press: Boca Raton, pp. 49-64.

- OKU H, SHIRAIISHI T, OUCHI S (1987) Role of specific suppressors in pathogenesis of *Mycosphaerella* spec. In: Nishimura S, Vance P, Doke N (eds) **Molecular Determinants of Plant Diseases**, Japan Scientific Society Press/Springer Verlag: Tokyo/Berlin, pp. 145-54.
- OKU H, SHIRAIISHI T, OUCHI S, ISHIURA M (1980) A new determinant of pathogenicity in plant disease. **Naturwissenschaften** 67: 310-1.
- ORTIZ R (1995) *Musa* genetics. In: Gowen S (ed) **Bananas and Plantain**, Ch 4, Chapman and Hall: London, pp. 84-109.
- ORTIZ R, VUYLSTEKE D, (1993) The genetics of black Sigatoka resistance, growth, and yield parameters in 4x and 2x plantain-banana hybrids. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, p. 379.
- ORTIZ R, VUYLSTEKE D (1994) Inheritance of black Sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids. **Theor Appl Genet** 89: 146-52.
- OUCHI S, OKU H (1982) Physiological basis of susceptibility induced by pathogens. In: Asada Y, Bushnell WR, Ouchi S, Vance CP (eds) **Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis**, Japan Scientific Society Press/Springer Verlag: Tokyo/Berlin, pp. 117-35.
- PANIS B, SWENNEN R (1993) Embryogenic *Musa* plant cell cultures: current and future applications. **Info Musa** 2: 3-6.
- PANIS B, VAN WAUWE A, SWENNEN R (1993) Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). **Pl Cell Rep** 12: 403-7.
- PANOPOULOS NJ, WALTON JD, WILLIS DK (1984) Genetic and biochemical basis of virulence in plant pathogens. In: Verma DPS, Hohn T (eds) **Genes Involved in Microbe-Plant Interactions**, Ch 13, Springer Verlag: Wien, pp. 339-74.
- PARLEVLIET JE (1979) The co-evolution of host-parasite systems. **Symb Bot Upsal** 22 (4): 39-45.
- PINKERTON F, STROBEL G (1976) Serinol as an activator of toxin production in alternated cultures of *Helminthosporium sacchari*. **Proc Natl Acad Sci** 73: 4007-11.
- PONS N (1990) Taxonomy of *Cercospora* and related genera. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 360-70.
- PRICE NS (1995) The origin and development of banana and plantain cultivation. In: Gowen S (ed) **Bananas and Plantains**, Ch 1, Chapman and Hall: London, pp. 1-12.
- PRINGLE RB, SCHEFFER RP (1964) Host specific plant toxins. **Annu Rev Phytopathol** 2: 133-56.
- RANGASWAMI G, NATARAJAN S (1966) Changes in the free amino acids and C:N ratios of banana leaves infected with fungal pathogens. **Indian Phytopathol** 19: 59-64.
- REHM S, ESPIG G (1984) Die Kulturpflanzen der Tropen und Subtropen. Verlag Eugen Ulmer: Hohenheim, 504 pp.
- REUVENI O (1990) Methods for detecting somaclonal variants in „Williams“ Bananas. In: Jarret RL (ed) **The Identification of Genetic Diversity of the Genus Musa**, INIBAP: Montpellier, pp. 108-13.
- RUDOLPH K (1976) Non-specific toxins. In: Heitefuss R, Williams PH (eds) **Physiological Plant Pathology**, Ch 4.2, Springer Verlag: Berlin, pp. 270-315.
- SACHS L (1992) Angewandte Statistik. 7. Aufl, Springer Verlag: Berlin, 848 pp.
- SÁGI L, PANIS B, REMY S, SCHOOF H, DE SMET K, SWENNEN R, CAMMUE BPA (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. **Bio/Technology** 13: 481-5.
- SÁGI L, REMY S, PANIS B, SWENNEN R, VOLCKAERT G (1994) Transient gene expression in electroporated banana protoplasts (*Musa* spp., cv. „Bluggoe“, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenetic cell suspensions. **Plant Cell Reports** 13: 262-6.

- SALLÉ G, PICHARD V, MOURICHON X (1990) Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and three cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 180-90.
- SCHEFFER RP (1976) Host-specific toxins in relation to pathogenesis and disease resistance. In: Heitefuss R, Williams PH (eds) **Physiological Plant Pathology**, Ch 4.1, Springer Verlag: Berlin, pp. 247-69.
- SCHEFFER RP, LIVINGSTON RS (1984) Host-selective toxins and their role in plant diseases. **Science** 223: 17-21.
- SCHULZ U, SCHEINPFLUG H, (1990) Methods to test the sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* to Triadimenol. **Brighton Crop Prot Conf**, 19.-22. Nov. 1990, pp.1147-1152.
- SCOWCROFT WR, LARKIN PJ, BRETTELL RIS (1983) Genetic variation from tissue culture. In: Helgeson JP, Deverall BJ (eds) **Use of Tissue Culture and Protoplasts in Plant Pathology**, Ch 5, Academic Press Australia: Sydney, pp. 139-62.
- SHILLINGFORD CA (1990) Use of systemic fungicides to control leaf spot disease in *Musa*. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 75-83.
- SHIRAIISHI T, YAMADA T, SAITOH K, KATO T, TOYODA K, YOSHIOKA H, HONG-MO K, ICHINOSE Y, TAHARA M, OKU H (1994) Suppressors: determinants of specificity produced by plant pathogens. **PI Cell Physiol** 35: 1107-19.
- SIGMA (1994) Pflanzenzellkultur-Katalog. o. A., 132 pp.
- SINGH H, FOLK TL, SCHEUER PJ (1969) Synthesis of juglone derivatives. Hydroxy, acetyl and ethyl substituents. **Tetrahedron** 25: 5301-10.
- SMITH DA (1982) Toxicity of phytoalexines. In: Bailey JA, Mansfield JW (eds) **Phytoalexines**, Ch 7, Blackie and Son: Glasgow, pp. 218-52.
- STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, SUGARAWA F (1992) Analytical methods for phytotoxins. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) **Plant Toxin Analysis**, Springer Verlag: Berlin, pp. 1-34.
- STIERLE AA, UPADHYAY R, HERSHENHORN J, STROBEL GA, MOLINA G (1991) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains. **Experientia** 47: 853-9.
- STIPANOVIC RD, BELL AA (1977) Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*. II. Accumulation of naphthol derivatives by the aberrant melanin-mutant *brm-2*. **Mycologia** 69: 164-72.
- STOESSL A (1981) Structure and biogenetic relations: fungal nonhost-specific. In: Durbin RD (ed) **Toxins in Plant Disease**, Ch 5, Academic Press: New York, pp. 109-200.
- STOVER RH (1978) Distribution and possible origin of *Mycosphaerella fijiensis* in southeast Asia. **Trop Agric** 55: 65-8.
- STOVER RH (1980) Sigatoka leaf spots of banana and plantains. **PI Dis** 64: 750-6.
- STOVER RH (1983) The effect of temperature on ascospore germ tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Fruits** 38: 625-8.
- STOVER RH (1990) Sigatoka leaf spots: thirty years of changing control strategies. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 66-74.
- STOVER RH, SIMMONDS NW (1987) Bananas. 3. Aufl, John Wiley & Sons Inc: New York, 468 pp.
- STRASBURGER E (1991) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A (eds), Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, 1030 pp.
- TEZENAS DU MONTCEL (1990) The susceptibility of various cultivated bananas to Sigatoka diseases. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 272-89.

- TOKOUSBALIDES MC, SISLER HD (1979) Site of inhibition by Tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. **Pesticide Biochem Physiol** 11: 64-73.
- UNGER KK (1989) Handbuch der HPLC. Teil 1, Leitfaden für Anfänger und Praktiker, GIT Verlag: Darmstadt, 360 pp.
- UPADHYAY RK, STROBEL GA, COVAL SJ, CLARDY J (1990) Fijiensin, the first phytotoxin from *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black Sigatoka disease. **Experientia** 46: 982-4.
- VANDERPLANK JE (1986) Specific susceptibility and specific feeding in gene-for-gene systems. **Adv Pl Pathol** 5: 199-223.
- VANDERPLANK JE (1991) The two gene-for-gene hypotheses and a test to distinguish them. **Pl Pathol** 40: 1-3.
- VASQUEZ N, TAPIA AC, GALINDO JJ (1990) Ultrastructural studies of the infection process of *Mycosphaerella fijiensis* on *Musa* cultivars. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) **Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana**, INIBAP: Montpellier, pp. 191-200.
- VIVIANI F, VIDAL-CROS A, GANDRY M (1993) Biosynthesis of melanin by *Pyricularia oryzae*. Inhibition by systemic fungicides. In: Fritig B, Legrand M (eds) **Mechanisms of Plant Defense Response**, Kluwer Academic Publ: Dordrecht, pp. 461.
- VUYLSTEKE DR (1989) Shoot-tip Culture for the Propagation, conservation and Exchange of *Musa* Germplasm. IBPGR: Rome, 43 pp.
- WALTON JD, PANACCIONE DG (1993) Host-selective toxins and disease specificity: perspectives and progress. **Annu Rev Phytopathol** 31: 275-303.
- WHEELER H (1976) The role of phytotoxins in specificity. In: Wood RKS, Graniti A (eds) **Specificity in Plant Disease**, Plenum Press: New York, pp. 217-30.
- WHEELER H (1981) Role in Pathogenesis. In: Durbin RD (ed) **Toxins in Plant Diseases**, Ch 13, Academic Press: New York, pp. 477-94.
- WHEELER MH (1983) Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. **Trans Br Mycol Soc** 81: 29-36.
- WHEELER MH, STIPANOVIC RD (1985) Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitis*. **Archs Microbiol** 142: 234-41.
- WITHERS LA (1993) Early detection of somaclonal variation. In: Ganry J (ed) **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD/INIBAP: Montpellier, pp. 200-8.
- WOOD RKS (1967) Physiological Plant Pathology. Blackwell Sci Publ: Oxford, 570 pp.
- YODER OC (1980) Toxins in pathogenesis. **Annu Rev Phytopathol** 18: 103-29.
- YODER OC (1981) Assay. In: Durbin RD (ed) **Toxins in Plant Disease**, Ch 3, Academic Press: New York, pp. 45-78.
- YODER OC, TURGEON BG, CIUFETTI LM, SCHAFER W (1989) Genetic analysis of toxin production by fungi. In: Graniti A, Durbin D, Ballio A (eds) **Phytotoxins and Plant Pathogenesis**, Springer Verlag: Berlin, pp. 43-60.
- YOSHIKAWA M (1983) Macromolecules, recognition, and the triggering of resistance. In: Callow JA (ed) **Biochemical Plant Pathology**, Ch 13, John Wiley and Sons Ltd: Chichester, pp. 267-97.
- YOSHIKAWA M, YAMAOKA N, TAKEUCHI Y (1993) Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. **Pl Cell Physiol** 34: 1163-73.
- ZEWELDU T (1997) Comparative tissue culture study on banana and plantain (*Musa spp.*) and development of *in vitro* methods for propagation of ensete (*Ensete spp.*). PhD Thesis Humboldt Universität zu Berlin.

8 Anhang

8.1 Verwendete Materialien und Geräte

Tab. 13 Nährstoffkonzentrationen der *in vitro*-Kultur von *Musa sp* (VUYLSTEKE 1989, SIGMA 1994, OKOLE 1995)

Substanz	Einheit	Murashige und Skoog			Schenk und Hildebrandt
<u>Makronährstoffe</u>		Multiplikation	Regeneration	Hardening	Kallus
NH ₄	mM	10,3	10,3	5,7	2,6
K	mM	10,0	10,0	5,0	24,7
Mg	mM	0,75	0,75	0,38	1,6
Ca	mM	1,5	1,5	0,75	1,4
Na	mM	0,1	0,1	0,05	0,1
NO ₃	mM	19,7	19,7	9,85	24,7
PO ₄	mM	0,63	0,63	0,32	2,6
SO ₄	mM	0,85	0,85	0,43	1,7
Cl	mM	3,0	3,0	1,5	2,7
<u>Mikronährstoffe</u>					
B	µM	100,0	100,0	50,0	81,0
Co	µM	0,1	0,1	0,05	0,1
Cu	µM	0,1	0,1	0,05	0,08
Fe	µM	100,0	100,0	50,0	47,0
J	µM	5,0	5,0	2,5	6,0
Mn	µM	100,0	100,0	50,0	59,0
Mo	µM	1,0	1,0	0,5	0,41
Zn	µM	30,0	30,0	15,0	3,5
<u>Vitamine und Aminosäuren</u>		(V)*	(O)*		
Glycin	mM	0,026	0,026	0,026	0,026
Pyridoxin	mM	0,003	0,003	0,003	0,003
Nikotinsäure	mM	0,004	0,004	0,004	0,004
Thiamin HCl	mM	0,15	0,15	0,15	
Myo-Inositol	mM	0,55	0,55	0,0	0,55
Ca-Panthothenat	µM		0,042		
p-Aminobenzoësre	µM		0,007		
Folsäure	µM		0,014		
Riboflavin	µM		0,013		
Cyanocobalamin	µM		0,006		
<u>Wuchsstoffe</u>					
BAP	µM	20,0	0,1	0,0	0,0
IAA	µM	100,0	0,0	0,0	10,0
NAA	µM	0,0	100,0	0,0	0,0
Dicamba	µM	0,0	0,0	0,0	20,0
<u>Antioxidans</u>					
Ascorbinsäure	mM	0,28	0,28	0,28	0,28
<u>Kohlenstoffquelle</u>					
Saccharose	mM	87,71	87,71	43,86	87,71
<u>Geliermittel</u>					
Gelrit	g l ⁻¹	2,25	2,25	2,25	2,25

*Zusammensetzung der Vitamine nach VUYLSTEKE (1989) bzw. OKOLE (1995)

Tab. 14 Nährstoffkonzentrationen der *in vitro*-Kultur von *Mf* (NIRENBERG 1976, PINKERTON und STROBEL 1976)

Substanz	Einheit	H ₂ O	SNA	PDA	GPA	M-1-D	Musa
<u>Makronährstoffe</u>							
KHPO ₄	mM		7,4				
Ca (NO ₃) ₂	mM					1,2	
KNO ₃	mM		9,9			0,79	
KCl	mM		6,71			0,87	
MgSO ₄	mM		4,16			3,0	
NaH ₂ PO ₄	mM					0,14	
NH ₄ -Tartrat	mM					27,1	
<u>Mikronährstoffe</u>							
FeCl ₃	μM					7,4	
MnSO ₄	μM					30,0	
ZnSO ₄	μM					8,7	
H ₃ BO ₃	μM					2,2	
KJ	μM					4,5	
<u>Kohlenstoffquellen</u>							
Glucose	mM		1,11		110,9		
Saccharose	mM		0,58			87,71	
<u>Sonstige Zusatzstoffe</u>							
Myo-Inositol	mM					2,77	
Thiamin	mM					0,74	
PD-Broth	g l ⁻¹			12,0			
Pepton	g l ⁻¹				5,0		
Bananenblatt	g FW l ⁻¹						1000,0
Kokoswasser	ml l ⁻¹					12,0	
<u>Geliermittel</u>							
Gelrite	g l ⁻¹	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0

Tab. 15 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Zulieferer	Eigenschaften
SPE-Kartuschen	Varian Bond-Elut	Aminopropyl NH1210-2014, 100 mg Cyanopropyl CN 1210-2008, 100 mg Octadecyl C18-OH1210-2065, 100 mg
	Sep-Pak	Silica, 500 mg
Filterpapier	Schleicher und Schüll	Faltenfilter 595½, £ 150 mm, F* 160 s Faltenfilter 2048½, £ 38.5 cm, F* 135 s Membranfilter aus reg. Zellulose RC 58, £ 13 mm, Porengröße 0.2 μm
	Sartorius	Membranfilter aus Polyamid, £ 45 mm, Porengröße 0.2 μm
	Faust	Sterilfilter aus Zellulosemischester, Porengröße 0.22 μm
HPLC-Säule	Muder und Wochele	Nucleosil 100 C 18, 5 μm
HPLC-Vorsäule	Muder und Wochele	Nucleosil 100 C 18, 5 μm
Zentrifugen-Ultrafilter	Restek	molekularer Cut-off: 100'000 Da

*Filtrationszeit nach Herzberg

Tab. 16 Chemikalien und Substrate

Common name	Systematischer o. alternativer Name	Zulieferer
BAP	6-Benzylaminopurin	Sigma B 9395
BSA	bovines Serumalbumin, Fraktion V	Merck 1.12018
Chlortetracyclin-Hydrochlorid		Sigma C-4881
Coomassie Brilliantblau G 250		Merck 1.02082
Bentonit	enth. >50% Monmorillonit, >15% Illit	Neudorff
Dicamba	3,6-Dichlor-2-Methoxybenzoesäure	Serva 19320
D-Phenylalanin	D-2-Amino-3-Phenylpropionsäure	Sigma P1751
1,5-Dihydroxynaphtalin	1,5-Naphtalindiol	Aldrich D 11,560-6
Einheitserde	ED 73	Gebr. Patzer GmbH
Evans Blue	Direct Blue 53	Sigma E 2129
Gelrite		Duchefa G 1101
Glycin	Aminoessigsäure	Sigma G 6143
Hakaphos Blau	Standardnährsalz 15-10-15-2	
Kalilauge	KOH	Merck 5021
IAA	Indol-3-Essigsäure	Sigma I 2886
Juglon	5-Hydroxy-1,4-Naphtochinon	Sigma J 0500
Kanamycin A		Sigma K 4000
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ purum p.a.	Fluka 60230
NAA	α-Naphtalenessigsäure	Sigma N 0640
Natriumchlorid	NaCl 99.5%	Heraeus 007010
Natriumhypochlorid	NaOCl 12% Cl	Roth 9062.1
Natronlauge	NaOH 1N	Merck 9956
L-Phenylalanin	L-2-Amino-3-Phenylpropionsäure	Sigma P 2126
2-Mercaptoethanol		Merck 805740
Myo-Inositol		Serva 26310
Ortho-Phosphorsäure	H ₃ PO ₄ 85%	VEB-Chemie Apolda
Penicillin G	Benzylpenicillin (Natriumsalz)	Sigma
Polyvinylpolypyrrolidon	PVPP	Sigma P 6755
Saccharose		Serva 35580
Schwefelsäure 95 - 97%	H ₂ SO ₄ p.a.	Merck 1.00731
Streptomycinsulfat		Sigma S-6501
Thiamin-HCl	Vitamin B1	Serva 36020
trans-Zimtsäure	3-Phenylpropionsäure	Sigma C 6004
Tricyclazol®	5-Methyl-1,2,4-triazolo(3,4-b)Benzothiazol	Dow Elanco
Tween 80		Difco 3118-15-6
Lösungsmittel		
Acetonitril HPLC-rein		Baker 0917
Chloroform p.a.		Merck 7386
Diethylether z.A.		Merck 1.00921
Essigsäureanhydrid z.A.		HUB-Chemie
Ethanol unverg.		HUB-Chemie
Ethylacetat p.a.		Merck 8037
Methanol p.a.		Merck 1.06009
n-Hexan p.a.		Merck 1.04367
Wasser HPLC-rein		Baker 4218

Tab. 17 Geräte

Bezeichnung	Zulieferer und Typenbez.	Eigenschaften
Festphasenextraktion	Baker spe-12G Nr. 7018-94	12 Positionen
<u>HPLC</u>		
-Pumpen	Irica Σ871	Doppelkolbensystem
-Entgasung	Erma CR Inc./ERC-3512	Online
-UV/Vis-Detektor	BarSpec Chrom-A-Scope No. 1970	190-370nm (Deuterium) 360-700nm (Halogen)
-Säulenofen	MTS Ingenieurbüro HA 2030	22-45°C, Wasserkühlung
-Probenaufgäbeventil	Rheodyne 7125	Probenschleife 20 µl
-Mischkammer	ERC	für Hochdruckgradient
-Steuersystem	BarSpec Data System Version 1.2	
-Säule mit Vorsäulenkartusche	Muder und Wochele	ID 250 (+10) x 4,0 mm
Inkubationsschüttler	Bühler SM 25 digi Inkubationshaube TH 25	Beleuchtung 15 W
Kühlbrutschränke	Rubarth Apparate GmbH	Beleuchtung 2 x 20 W
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor	Jouen GR 20 22	max. 8150 g, min. 4°C
Mikroskopkamera	Zeiss Jena 100	
Pflanzenwuchsschrank	Heraeus-Vötsch HPS 1500	max. 400 µEinstein m ⁻² s ⁻¹ max. 70% RH bei 25°C
pH-Meter mit Elektrode	Orion Research 701A Mettler Toledo InLab 422	digital, pH .001 pH 0-14, 0-80°C
Präzisionswaage	Sartorius 2002 MP1	d=0.1 mg
<u>Rotationsverdampfer</u>		
-Vakuumsystem	Büchi B-172, B-173, KVV-Technik 800	
-Wasserbad	Büchi B-480, Heidolph WB 2000	
-Senkrechtkühler	Büchi	
-Diagonalkühler mit Auto-Hub	Heidolph VV 2000	
<u>Spektralphotometer</u>	Kontron 922	190 - 900 nm
-Küvettenwechsler 12x	Kontron 900	2 x 6
-UV-Küvetten	Hellma 104-QS, Halbmikro	
-Inkubationsbad	LKB 2219	
Stereomikroskop SV8	Zeiss Jena	Vergrößerung 8 - 64x
Trockenschrank	Memmert UM 500	
Ultra-Turrax mit Dispergierwerkzeug	T 25 S25N-18G	24000 rpm
Universalmikroskop Axioplan	Zeiss Jena	Vergrößerung 25 - 1000x
Vakuumfiltration mit Membranfilter	Schleicher und Schüll Sartorius	1000 ml
Vertikalstrombank	Steag LF-RF 06.15	1500 m ³ h ⁻¹

8.2 Methoden

Tab. 18 TL-chromatographische Systeme

	System A (STIERLE et al 1991)	System B (KEEN 1978)	System C (LUIS et al 1993)	System D (SINGH et al 1969)
Mobile Phase	CHCl ₃ :MeOH 9:1	Hexan:EtOAc:MeOH 60:40:1	Et ₂ O:Hexan 3:1	Et ₂ O
Entwicklungszeit (min)	90	90	75	12
Probenaufgabe (µl)	-----10-----			
Stationäre Phase	-----Silica 60 F ₂₅₄ , 20 x 20 cm-----			
Entwicklung	Vertikalkammer, eindimensional, H ₂ SO ₄ (5.0% in EtOH), Trocknung 110°C			

Tab. 19 HPL-chromatographische Systeme

	System A (GREENBLATT und WHEELER 1986)	Sytem B (EDWARDS und KESSMANN 1992)
Mobile Phase	MeCN:50 mM KH ₂ PO ₄ 13.4 - 43.5% in 18 min, 1.2 ml min ⁻¹	MeCN:50 mM KH ₂ PO ₄ 15 - 65% in 45 min, 0.8 ml min ⁻¹
Detektion (nm)	254	280
Probenaufgabe	Rheodyne, 20 µl Probenschleife	
Stationäre Phase	C 18 Nucleosil, 250 x 4 cm, 5 µm ODS, Vorsäule 10 x 4 cm, Säulentemperatur 32°C	

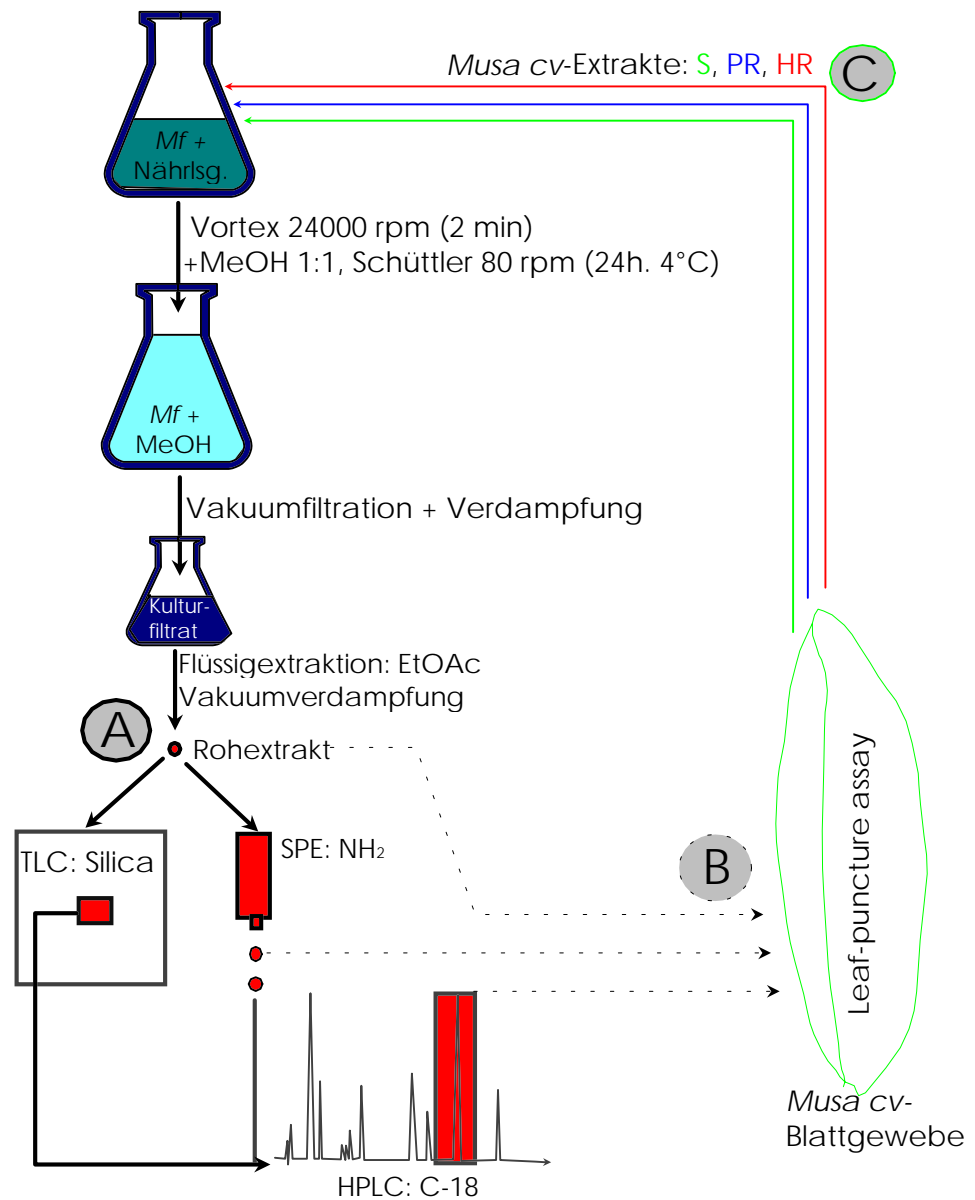


Abb. 44 Material und Methoden der Gewinnung von Sekundärmetaboliten aus *Mf*-Flüssigkulturen (A, dicke schwarze Pfeile), Applikation von pilzlichen Substanzen auf Blattgewebe verschiedener *Musa cv* (B, dünne schwarze Pfeile) und Nutzung pflanzlicher Extrakte zur Inkubation des Pilzes (C, farbige durchgezogene Pfeile)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1994 bis Februar 1998 im Fachgebiet Phyto-medizin/Angewandte Entomologie der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät (LGF) der Humboldt-Universität zu Berlin (HUB) angefertigt und mit einem Stipendium nach dem Nachwuchsförderungsgesetz (NaFöG) der Berliner Senatsverwaltung für Wissenschaft und Forschung finanziell unterstützt. Die Gewebekulturen der Bananensorten wurden vom Netzwerk INIBAP an der Katholieke Universiteit Leuven/Belgien, der Wirkstoff Tricyclazol® von DowElanco in Norfolk/England unentgeltlich zur Verfügung gestellt. Die GC- und MS-Analysen pilzlicher Sekundärmetaboliten wurden am Fachinstitut für Angewandte Analytik und Umweltchemie und die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Bananenkali am Fachgebiet Pflanzenernährung der HU Berlin freundlicherweise durchgeführt.

Allen Institutionen und Personen, die zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle herzlich gedankt, namentlich den Kolleginnen und Kollegen:

Reinhard Bischoff für den nicht nur fachlichen Austausch während unserer Doktorandenzeit;

Norbert Bismarck für die praktische Hilfestellung im technischen Bereich;

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bochow für die akademische Betreuung und Begutachtung der gesamten Arbeit;

Gabriele Buddruss für die logistische und phototechnische Unterstützung;

Herrn Prof. Dr. Deml für die Diskussion und Begutachtung der vorliegenden Arbeit;

Dr. Erika Fischer für die unentwegte Sorge um und Betreuung von Werk und Autor;

Silke Gens für die Versorgung der Bananenpflanzen unter *ex vitro*-Bedingungen;

Frau Dr. Goßmann für die Bestimmung und Bereitstellung von pilzlichen Organismen;

Frau Haack für die administrative Bewältigung des Verfahrens;

Dr. Jürgen Helbig für die kontinuierliche fachliche und logistische Unterstützung der Experimente und die kritische Durchsicht des Manuskripts;

Renate Junge für die Bemühungen um sichere Handhabung von Laborgeräten;

Andrea Klink für die Einführung in die Laborarbeit und die Versorgung mit dem notwendigen Nachschub an Materialien;

Herrn Dr. Lehmann von der Bundesanstalt für Materialforschung für seine Bemühungen um den Nachweis pilzlicher Metaboliten mit Hilfe der HPLC-MS-Kopplung;

Thomas Meinel von der Universität Potsdam für die engagierte Diskussion der Ergebnisse;

Herrn Dr. Michael vom Institut für Chemie der HU Berlin für die Geduld und Kompetenz bei den GC- und GC/MS-Analysen der pilzlichen Metaboliten;

Katharina Müller für die abschließende sprachliche Korrektur des Manuskriptes;

Dr. Blessed Okole für die Einarbeitung in das Thema und die Überlassung der Bananen- und Pilzsammlung;

Frau Ortmann für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Kalli;

Herrn Prof. Dr. Schulz (t) für sein Vertrauen bei der Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Suche nach Förderungsmöglichkeiten;

Frau Seifarth für die administrative Hilfe am Beginn des Vorhabens;

Dr. Antje Wewetzer für die ideelle und materielle Unterstützung in der ersten Phase der experimentellen Arbeit;

Frau Wolf für die unentbehrliche humorvolle Kommentierung der Laborpraxis.

Darüber hinaus versichere ich, die Arbeit auf der Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen selbständig durchgeführt und verfaßt zu haben.